

# UNIVERSIDAD DE CUENCA



## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

### “VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO ASIMILABLE Y FÓSFORO EN SUELO”

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO  
A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO  
DE INGENIERA QUÍMICA

**AUTORA:**

YESSSENIA VERÓNICA GUARACA BECERRA  
C.I. 0104977772

**DIRECTORA:**

MST. SONIA MARGOTH ASTUDILLO OCHOA  
C.I. 0104044474

**CUENCA – ECUADOR**

**2018**



## **RESUMEN**

El presente proyecto de investigación se desarrolló en el Laboratorio de análisis de suelos de la Facultad de Ciencias Químicas y tiene como objetivo validar métodos analíticos, para la determinación de nitrógeno asimilable en forma de nitrógeno amoniacal y fósforo disponible para las plantas en el suelo, mediante espectrofotometría ultravioleta – visible, con el propósito de que a futuro este laboratorio ofrezca el servicio al público empleando métodos validados, garantizando la fiabilidad de los resultados.

Para lo cual, se realizaron una serie de experimentos, tanto para determinar fósforo disponible como nitrógeno amoniacal. Los resultados procedentes de la validación del método de determinación de fósforo disponible fueron: exactitud 96 % de recuperación, precisión 5 % de coeficiente de variación; linealidad 0,9999 en función del coeficiente de determinación ( $r^2$ ), límite de cuantificación de 0,5 ppm P. Los resultados obtenidos de la validación del método de determinación de nitrógeno amoniacal fueron: exactitud 89% de recuperación, precisión 25% de coeficiente de variación; linealidad 0,9988 en función del coeficiente de determinación ( $r^2$ ), límite de cuantificación de 1 ppm N-NH<sub>4</sub>. Es importante mencionar que este estudio no contempla el cálculo de la incertidumbre, debido a que el mismo demanda tiempo y recursos económicos. A partir de los resultados obtenidos, ambos métodos analíticos se declaran validados, de acuerdo a los parámetros de validación seleccionados y a los objetivos fijados.

**Palabras clave:** Validación, nitrógeno amoniacal, fósforo disponible, suelo, espectrofotometría UV- Vis.



## **ABSTRACT**

The present investigation project was developed in the Soil Analysis Laboratory of the Faculty of Chemical Sciences and have as a goal to validate analytical methods, for the determination of assimilable nitrogen in the form of ammoniacal nitrogen and phosphorus available for plants in the soil, through ultraviolet - visible spectrophotometry, with the purpose that in the future this laboratory offers the service to the public using validated methods, ensuring the reliability of the results.

For which, a series of experiments were carried out, both to determine available phosphorus as ammoniacal nitrogen. The results from the validation of the available phosphorus determination method were: accuracy 96% recovery, precision 5% coefficient of variation; linearity 0,9999 according to the coefficient of determination ( $r^2$ ), limit of quantification of 0,5 ppm P. The results obtained from the validation of the ammoniacal nitrogen determination method were: accuracy 89% recovery, precision 25% coefficient of variation; linearity 0,9988 according to the coefficient of determination ( $r^2$ ), limit of quantification of 1 ppm N-NH<sub>4</sub>. It is important to mention that this study does not contemplate the uncertainty calculation, because it requires time and economic resources. Based on the obtained results, both analytical methods are declared validated, according to the selected validation parameters and the selected objectives.

**Keywords:** Validation, ammoniacal nitrogen, phosphorus available, soil, UV-Vis spectrophotometry.



## ÍNDICE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT .....	3
DEDICATORIA .....	11
AGRADECIMIENTOS .....	12
INTRODUCCIÓN.....	13
OBJETIVOS .....	14
<b>1    MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
1.1    EL SUELO .....	15
1.2    ELEMENTOS NUTRITIVOS NECESARIOS PARA EL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS .....	15
1.2.1    MACRONUTRIENTES .....	16
1.2.1.1    NUTRIENTES PRIMARIOS.....	16
1.2.1.1.1    Nitrógeno.....	16
1.2.1.1.2    Fósforo.....	17
1.2.1.1.3    Potasio .....	17
1.2.1.2    NUTRIENTES SECUNDARIOS .....	17
1.2.1.2.1    Calcio .....	17
1.2.1.2.2    Magnesio .....	17
1.2.1.2.3    Azufre.....	18
1.2.2    MICRONUTRIENTES .....	18
1.3    NITRÓGENO EN EL SUELO .....	18
1.3.1    FIJACIÓN DEL NITRÓGENO ATMOSFÉRICO.....	19
1.3.1.1    FIJACIÓN ATMOSFÉRICA.....	19
1.3.1.2    FIJACIÓN BIOLÓGICA .....	19
1.3.2    MINERALIZACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA.....	20
1.3.3    NITRÓGENO AMONIAL .....	21
1.3.4    NITRÓGENO NÍTrico .....	22
1.3.5    CICLO DEL NITRÓGENO EN EL SUELO .....	22
1.4    FÓSFORO EN EL SUELO .....	23
1.4.1    FIJACIÓN DEL FÓSFORO EN EL SUELO .....	23
1.4.2    FORMAS ASIMILABLES DE FÓSFORO .....	23
1.4.3    CICLO DEL FÓSFORO EN EL SUELO.....	24
1.5    ANÁLISIS QUÍMICOS DE LOS SUELOS.....	25
1.5.1    SOLUCIONES QUÍMICAS EXTRACTORAS.....	25
1.6    MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO AMONIAL EN SUELO .....	26
1.6.1    MÉTODO DE KJELDAHL.....	26
1.6.2    DETERMINACIÓN MEDIANTE EL USO DE UN ELECTRODO DE IÓN SELECTIVO .....	27
1.6.3    MÉTODO DE OLSEN MODIFICADO .....	27
1.7    MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE FÓSFORO DISPONIBLE EN SUELO .....	28
1.7.1    MÉTODO DE BRAY I .....	28
1.7.2    MÉTODO CAROLINA DEL NORTE .....	28
1.7.3    MÉTODO PEECH MORGAN.....	28
1.7.4    MÉTODO DE OLSEN MODIFICADO .....	29
1.8    ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN UV-VISIBLE .....	29
1.9    VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	30
1.9.1    PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DE LOS MÉTODOS.....	30
1.9.1.1    INTERVALO DE TRABAJO.....	31
1.9.1.2    LINEALIDAD .....	31
1.9.1.3    LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD).....	32
1.9.1.4    LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ).....	32
1.9.1.5    EXACTITUD.....	33



1.9.1.6	PRECISIÓN .....	34
1.9.1.7	REPETIBILIDAD .....	35
1.9.1.8	REPRODUCTIBILIDAD .....	36
1.9.1.9	PRECISIÓN INTERMEDIA (REPRODUCTIBILIDAD DENTRO DEL LABORATORIO) .....	36
<b>2</b>	<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>37</b>
2.1	MUESTREO DEL SUELO .....	37
2.1.1	<i>OBJETO</i> .....	37
2.1.2	<i>UBICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LA ZONA A MUESTREAR</i> .....	37
2.1.3	<i>PREPARACIÓN PREVIA AL MUESTREO DE SUELO</i> .....	38
2.1.4	<i>MATERIALES</i> .....	39
2.1.5	<i>PROCEDIMIENTO</i> .....	39
2.1.6	<i>PRECAUCIONES</i> .....	41
2.2	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS .....	41
2.2.1	<i>MATERIALES</i> .....	42
2.3	PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN EXTRACTANTE OLSEN MODIFICADA pH 8,5 .....	42
2.3.1	<i>OBJETO</i> .....	42
2.3.2	<i>EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS</i> .....	42
2.3.2.1	<i>EQUIPOS</i> .....	42
2.3.2.2	<i>MATERIALES</i> .....	43
2.3.2.3	<i>REACTIVOS</i> .....	43
2.3.3	<i>PROCEDIMIENTO</i> .....	43
2.4	PROCESO DE VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS .....	44
2.5	VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE OLSEN MODIFICADO PARA DETERMINAR FÓSFORO DISPONIBLE EN SUELO POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS .....	48
2.5.1	<i>OBJETO</i> .....	48
2.5.2	<i>ALCANCE</i> .....	48
2.5.3	<i>REFERENCIAS</i> .....	48
2.5.4	<i>PRINCIPIO O FUNDAMENTO TÉCNICO DEL ENSAYO</i> .....	48
2.5.5	<i>EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS</i> .....	49
2.5.5.1	<i>EQUIPOS</i> .....	49
2.5.5.2	<i>MATERIALES</i> .....	50
2.5.5.3	<i>REACTIVOS</i> .....	50
2.5.6	<i>PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO</i> .....	51
2.5.6.1	<i>SOLUCIÓN “A” REACTIVO CONCENTRADO</i> .....	51
2.5.6.2	<i>SOLUCIÓN “B” REACTIVO DE COLOR PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO</i> .....	51
2.5.6.3	<i>PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PATRÓN MADRE DE FÓSFORO Y DE LAS SOLUCIONES ESTÁNDAR PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN</i> .....	52
2.5.6.3.1	<i>Solución patrón madre de fósforo</i> .....	52
2.5.6.3.2	<i>Soluciones estándar de fósforo</i> .....	52
2.5.6.4	<i>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO</i> .....	52
2.5.6.4.1	<i>Muestra de suelo</i> .....	52
2.5.6.4.2	<i>Soluciones estándar de fósforo (Preparación de la curva de calibración)</i> .....	53
2.5.6.5	<i>MEDIDAS DE SEGURIDAD</i> .....	53
2.5.6.6	<i>INFORME DE RESULTADOS, CÁLCULOS Y UNIDADES</i> .....	53
2.5.6.6.1	<i>Cálculos y unidades</i> .....	54
2.5.6.7	<i>CRITERIOS DE ACEPTACIÓN O RECHAZO</i> .....	54
2.5.6.8	<i>CONTROL DE CALIDAD</i> .....	54
2.5.7	<i>PARÁMETROS DE VALIDACIÓN</i> .....	54
2.5.8	<i>SELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN – FIJACIÓN DE LOS OBJETIVOS</i> .....	54
2.5.9	<i>DISEÑO EXPERIMENTAL</i> .....	55
2.6	VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE OLSEN MODIFICADO PARA DETERMINAR NITRÓGENO AMONICAL EN SUELO POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS .....	57
2.6.1	<i>PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS</i> .....	57
2.6.2	<i>OBJETO</i> .....	57
2.6.3	<i>ALCANCE</i> .....	57
2.6.4	<i>REFERENCIAS</i> .....	57



2.6.5	PRINCIPIO O FUNDAMENTO TÉCNICO DEL ENSAYO .....	57
2.6.6	EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS .....	58
2.6.6.1	EQUIPOS.....	58
2.6.6.2	MATERIALES .....	58
2.6.6.3	REACTIVOS .....	58
2.6.7	PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO AMONIAL.....	59
2.6.7.1	FENOL BÁSICO .....	59
2.6.7.2	SOLUCIÓN DE HIPOCLORITO DE SODIO AL 5% .....	59
2.6.7.3	PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PATRÓN MADRE DE NITRÓGENO Y DE LAS SOLUCIONES ESTÁNDAR PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN .....	60
2.6.7.3.1	Solución patrón madre de nitrógeno.....	60
2.6.7.3.2	Soluciones estándar de nitrógeno .....	60
2.6.7.4	PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO AMONIAL .....	61
2.6.7.4.1	Muestra de suelo .....	61
2.6.7.4.2	Soluciones estándar de nitrógeno (Preparación de la curva de calibración) .....	61
2.6.7.5	MEDIDAS DE SEGURIDAD .....	61
2.6.7.6	INFORME DE RESULTADOS, CÁLCULOS Y UNIDADES .....	62
2.6.7.6.1	Cálculos y unidades .....	62
2.6.7.7	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN O RECHAZO .....	62
2.6.7.8	CONTROL DE CALIDAD .....	62
2.6.8	PARÁMETROS DE VALIDACIÓN.....	62
2.6.9	SELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN – FIJACIÓN DE LOS OBJETIVOS	62
2.6.10	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	63
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	65
3.1	RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE OLSEN MODIFICADO PARA DETERMINAR FÓSFORO DISPONIBLE EN SUELO POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS .....	65
3.1.1	PRECISIÓN (REPETIBILIDAD/REPRODUCTIBILIDAD).....	65
3.1.2	EXACTITUD.....	69
3.1.3	LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD) .....	70
3.1.4	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ).....	71
3.1.5	SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD.....	72
3.1.6	FUNCIÓN DE RESPUESTA .....	73
3.1.6.1	INTERVALO DE TRABAJO VALIDADO .....	73
3.1.6.2	FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL / LINEALIDAD.....	73
3.1.6.3	RANGOS (BAJO, MEDIO Y ALTO) .....	75
3.2	RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE OLSEN MODIFICADO PARA DETERMINAR NITRÓGENO AMONIAL EN SUELO POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS..	76
3.2.1	PRECISIÓN (REPETIBILIDAD/REPRODUCTIBILIDAD).....	76
3.2.2	EXACTITUD.....	79
3.2.3	LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD) .....	79
3.2.4	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ).....	80
3.2.5	SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD.....	81
3.2.6	FUNCIÓN DE RESPUESTA .....	82
3.2.6.1	INTERVALO DE TRABAJO VALIDADO .....	82
3.2.6.2	FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL / LINEALIDAD.....	82
3.2.6.3	RANGOS (BAJO, MEDIO Y ALTO) .....	83
4	CONCLUSIONES .....	84
5	RECOMENDACIONES .....	86
	BIBLIOGRAFÍA .....	87
	ANEXOS .....	92
	ANEXO 1. ETIQUETADO DE UNA MUESTRA BÁSICO .....	92
	ANEXO 2. RESULTADOS INIAP – ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL AUSTRO .....	93



ANEXO 3. RESULTADOS INIAP – ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL LITORAL SUR .....	97
ANEXO 4. FOTOGRAFÍAS .....	99

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Materiales necesarios para el muestreo .....</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 2. Materiales necesarios para la preparación de la muestra de suelo .....</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 3. Equipos necesarios para la preparación de la solución extractante .....</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 4. Materiales empleados para la preparación de la solución extractante.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabla 5. Reactivos necesarios para la preparación de la solución extractante .....</i>	<i>43</i>
<i>Tabla 6. Equipos necesarios para la determinación de fósforo en suelo.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabla 7. Materiales empleados para la determinación de fósforo en un extracto de suelo</i>	<i>50</i>
<i>Tabla 8. Reactivos empleados para la determinación de fósforo en un extracto de suelo ..</i>	<i>50</i>
<i>Tabla 9. Preparación de soluciones estándar necesarias para obtener la curva de calibración de P .....</i>	<i>52</i>
<i>Tabla 10. Parámetros de validación para el método de fósforo disponible .....</i>	<i>54</i>
<i>Tabla 11. Equipos necesarios para la determinación de nitrógeno amoniacal en el extracto de suelo .....</i>	<i>58</i>
<i>Tabla 12. Materiales empleados para la determinación de nitrógeno amoniacal en el extracto de suelo .....</i>	<i>58</i>
<i>Tabla 13. Reactivos empleados para la determinación de nitrógeno amoniacal en un extracto de suelo .....</i>	<i>59</i>
<i>Tabla 14. Preparación de soluciones estándar necesarias para obtener la curva de calibración.....</i>	<i>60</i>
<i>Tabla 15. Parámetros de validación para el método de nitrógeno amoniacal.....</i>	<i>63</i>
<i>Tabla 16. Resultados del análisis de una muestra de suelo (Fósforo disponible) .....</i>	<i>66</i>
<i>Tabla 17. Estructura de una tabla ANOVA de un factor .....</i>	<i>67</i>
<i>Tabla 18. Resultado ANOVA de un factor.....</i>	<i>68</i>
<i>Tabla 19. Porcentaje de recuperación R (%) (Análisis del fósforo disponible en suelo) ....</i>	<i>69</i>
<i>Tabla 20. Límite de detección (LOD) fósforo.....</i>	<i>70</i>
<i>Tabla 21. Límite de cuantificación calculado (LOQ) fósforo .....</i>	<i>71</i>
<i>Tabla 22. Verificación del límite de cuantificación (LOQ) fósforo .....</i>	<i>72</i>
<i>Tabla 23. Resultados función respuesta .....</i>	<i>74</i>
<i>Tabla 24. Resultados rangos (Bajo, medio y alto) fósforo .....</i>	<i>75</i>
<i>Tabla 25. Resultados del análisis de una muestra de suelo (Nitrógeno Amoniacal).....</i>	<i>77</i>
<i>Tabla 26. Resultado ANOVA de un factor.....</i>	<i>78</i>
<i>Tabla 27. Porcentaje de recuperación R (%), análisis de nitrógeno amoniacal en suelo ....</i>	<i>79</i>
<i>Tabla 28. Límite de detección (LOD) nitrógeno amoniacal .....</i>	<i>79</i>
<i>Tabla 29. Límite de cuantificación calculado (LOQ) nitrógeno amoniacal .....</i>	<i>80</i>
<i>Tabla 30. Verificación del límite de cuantificación (LOQ) nitrógeno amoniacal .....</i>	<i>81</i>
<i>Tabla 31. Resultados función respuesta .....</i>	<i>82</i>
<i>Tabla 32. Resultados rangos (Bajo, medio y alto) nitrógeno amoniacal.....</i>	<i>83</i>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Proceso de mineralización de la materia orgánica .....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 2. Ciclo del nitrógeno en el suelo .....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 3. Ciclo del fósforo en el suelo .....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 4. Esquema de un espectrofotómetro UV – Vis de haz simple .....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 5. Croquis .....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 6. Toma de submuestras en forma de zig-zag en la zona de estudio.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 7. Toma de muestra de suelo (Corte en V) .....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 8. Proceso de cuarteo .....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 9. Esquema de diseño experimental .....</i>	<i>46</i>

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

<i>Fotografía 1. Granja Integral Municipal San Antonio .....</i>	<i>37</i>
<i>Fotografía 2. Muestreo del suelo .....</i>	<i>99</i>
<i>Fotografía 3. Tamizaje del suelo .....</i>	<i>99</i>
<i>Fotografía 4. Proceso de cuarteo .....</i>	<i>99</i>
<i>Fotografía 5. Solución Olsen modificada pH 8,5.....</i>	<i>99</i>
<i>Fotografía 6. Adición de la solución Olsen.....</i>	<i>99</i>
<i>Fotografía 7. Obtención del extracto de suelo .....</i>	<i>99</i>
<i>Fotografía 8. Determinación de fósforo.....</i>	<i>100</i>
<i>Fotografía 9. Determinación de fósforo.....</i>	<i>100</i>
<i>Fotografía 10. Determinación de nitrógeno amoniacal.....</i>	<i>100</i>
<i>Fotografía 11. Determinación de nitrógeno amoniacal.....</i>	<i>100</i>
<i>Fotografía 12. Lectura en el espectrofotómetro UV-Vis.....</i>	<i>101</i>





**Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio  
Institucional**

---

Yo, Yessenia Verónica Guaraca Becerra en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **"VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO ASIMILABLE Y FÓSFORO EN SUELO"**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 21 de Agosto de 2018

---

Yessenia Verónica Guaraca Becerra

C.I: 0104977772



Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Yo, Yessenia Verónica Guaraca Becerra, autora del trabajo de titulación **“VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO ASIMILABLE Y FÓSFORO EN SUELO”**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 21 de Agosto de 2018

---

Yessenia Verónica Guaraca Becerra

C.I: 0104977772



## **DEDICATORIA**

Este proyecto de investigación en primer lugar se lo dedico a Dios, por darme la fortaleza, sabiduría y salud para poder alcanzar todos los objetivos propuestos desde que inicie con mis estudios universitarios.

A mis padres, Lourdes y Guillermo, por su apoyo incondicional, consejos y motivación; todos mis logros se los debo a ustedes. Con todo el cariño, les dedico este proyecto, en reconocimiento de todo el esfuerzo y sacrificio que han hecho a lo largo de todos estos años para permitirme estudiar una carrera universitaria.

También dedico este proyecto, a Xavier López, gracias por su apoyo en los momentos más tormentosos, por motivarme y ayudarme incondicionalmente en todo lo que estaba a su alcance.

A mis hermanos, por sus palabras de aliento en los momentos más difíciles.



## **AGRADECIMIENTOS**

De manera muy especial, quiero agradecer a la Directora de este proyecto de investigación, la Ingeniera Sonia Astudillo Ochoa, por la confianza depositada en mi persona, por su apoyo incondicional, paciencia y por brindarme sus conocimientos y experiencia científica, mismos que han sido fundamentales para el desarrollo de esta tesis.

Al Ingeniero Maximiliano Ochoa Neira, director del Instituto Autónomo de Investigaciones Agropecuarias de la Estación Experimental del Austro, por la oportunidad de realizar visitas técnicas al Laboratorio de Suelos y Aguas, mismas que sirvieron para reforzar conocimientos y aprender los métodos de análisis de cationes en suelo.

Al Ingeniero Pedro Guerrero Ortiz, responsable del Laboratorio de Suelos y Aguas de la Estación Experimental del Austro, por todos los conocimientos transmitidos, paciencia, apoyo y dedicación; además, por permitirme participar y guiarme en todo momento en las actividades desarrolladas dentro del laboratorio en cada visita técnica.

También, quiero agradecer a todos los docentes que han intervenido a lo largo de estos años de formación académica y a quienes desinteresadamente me brindaron su ayuda para poder elaborar este proyecto de titulación.



## **INTRODUCCIÓN**

El análisis de suelos, nos permite conocer las deficiencias o excesos de nutrientes presentes en el suelo. Actualmente, se considera como una herramienta fundamental para definir la dosis de fertilizantes y abonos a aplicar (Correndo & García, 2017; Salinas & García, 1985). En el análisis de la fertilidad de suelos de uso agrícola, la determinación de fósforo y nitrógeno son muy importantes, ya que estos elementos son considerados junto con el potasio como macronutrientes primarios, indispensables para el crecimiento de las plantas (Dirección de fomento de tierras y aguas, 2002; M. Rodríguez & Flórez, 2004).

El laboratorio de análisis de suelos de la Facultad de Ciencias Químicas, cuenta con equipos, instrumentos y reactivos necesarios para realizar análisis físico químicos en suelos; mismos que son empleados con fines educativos. Este trabajo de titulación busca validar métodos analíticos, para determinar nitrógeno asimilable como nitrógeno amoniacal y fósforo disponible para las plantas en el suelo, mediante espectrofotometría ultravioleta – visible, con el fin de que la facultad a futuro ofrezca al público, servicios de análisis de suelos contando con métodos analíticos validados como los que se plantean en esta investigación, o bien se realicen análisis con fines investigativos dentro de la universidad; para ello el laboratorio debe asegurar su calidad, cumpliendo con ciertos parámetros de desempeño de los métodos como son: linealidad, exactitud, precisión (repetibilidad, reproductibilidad), límite de detección y límite de cuantificación; de este modo se demostrará si los métodos planteados son idóneos para su uso previsto o aplicación (Espinoza, 2018; Guía Eurachem, 2016). Además, es importante mencionar que en Ecuador todo laboratorio de análisis que pretenda la acreditación del Organismo de Acreditación Ecuatoriana (SAE), como primer paso para ello debe validar adecuadamente su metodología.

Por otro lado, en este proyecto de investigación, se analizará una muestra de suelo tomada de la Granja Integral Municipal San Antonio ubicada en el cantón Gualaceo, y con ello se aportará con información valiosa para la dicha granja; ya que según el ingeniero encargado de la misma, indica que no se ha realizado ningún tipo de análisis en dicho suelo por más de un año, el mismo que es destinado a la siembra de varios cultivos.



## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Validar los métodos analíticos para la determinación de nitrógeno asimilable y fósforo en suelo.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Fijar los parámetros de validación de los métodos (Linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y límite de cuantificación).
- Elaborar el diseño experimental y desarrollar los ensayos del diseño.
- Realizar análisis bajo condiciones de repetibilidad y reproductibilidad.
- Realizar un tratamiento estadístico de los resultados obtenidos.
- Declarar el método validado.



## **1 MARCO TEÓRICO**

### **1.1 EL SUELO**

El suelo se considera como una capa superficial de la corteza terrestre, donde habitan plantas y organismos vivos. De manera general, se puede decir que, en el suelo encontramos material procedente de rocas, sustancias orgánicas e inorgánicas generadas por organismos vivos, agua y aire (Gliessman, 2002). El suelo además de dar soporte a las plantas, es una capa permeable que permite el desarrollo de las raíces y dispone de nutrientes y agua para el desarrollo de las mismas (Casanova Olivo, 2005; Dirección de fomento de tierras y aguas, 2002).

Según, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO (2015), el sistema alimentario depende de la calidad de los suelos, ya que los mismos son el medio donde crecen las plantas destinadas al cultivo de alimentos; por ende un suelo sano genera alimentos sanos.

### **1.2 ELEMENTOS NUTRITIVOS NECESARIOS PARA EL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS**

Las plantas de manera general para su crecimiento y reproducción requieren esencialmente de 16 elementos, los mismos que provienen del aire, suelo y agua. Estos elementos esenciales son: carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), azufre (S), hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), cobre (Cu), boro (B), molibdeno (Mo) y cloro (Cl) (Gliessman, 2002; Welch & Shuman, 1995). Del aire las plantas obtienen básicamente el carbono a partir del CO<sub>2</sub>, el agua en cambio les provee de hidrógeno y oxígeno; los otros 13 elementos restantes son proporcionados por el suelo; cabe mencionar que, las plantas toman los nutrientes de la solución del suelo (Dirección de fomento de tierras y aguas, 2002; Prendes, Khouri, & López, 2006).

Según, Blaya & García (2003), para que un elemento se considere como esencial para las plantas, se deben tomar en cuenta los siguientes criterios:



- Es un elemento esencial, cuando su deficiencia hace imposible que una planta complete su ciclo de vida.
- Es un elemento esencial, si la función de dicho elemento no puede reemplazarse por otro elemento.
- Es un elemento esencial, si pertenece a alguna molécula o constituyente de la planta, la cual sea fundamental para la misma.

A su vez, dependiendo de la cantidad de elemento nutritivo que requiera absorber la planta, los elementos antes mencionados se clasifican en: *macronutrientes* y *micronutrientes*.

### **1.2.1 MACRONUTRIENTES**

Se denominan macronutrientes, debido a que las plantas requieren de estos elementos en grandes cantidades para su crecimiento (Dirección de fomento de tierras y aguas, 2002). Se consideran como macronutrientes o macroelementos al nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre; estos elementos normalmente se encuentran en concentraciones superiores al 0,1 % (masa seca) en el tejido de las plantas (Welch & Shuman, 1995).

Los macronutrientes, de acuerdo a la Dirección de fomento de tierras y aguas (2002), se dividen en:

- **Nutrientes primarios:** *nitrógeno, fósforo y potasio.*
- **Nutrientes secundarios:** *calcio, magnesio y azufre.*

#### **1.2.1.1 NUTRIENTES PRIMARIOS**

##### **1.2.1.1.1 Nitrógeno**

Este elemento se encuentra en los tejidos vegetales jóvenes alrededor del 2%, del peso total seco; sin embargo a medida que una planta envejece este porcentaje de nitrógeno se reduce (Prendes et al., 2006). El nitrógeno en las plantas al formar parte de los aminoácidos y proteínas, estará involucrado en los procesos concernientes al desarrollo vegetativo (Dirección de fomento de tierras y aguas, 2002).

Las raíces absorben el nitrógeno inorgánico, el mismo se encuentra en forma de nitrato ( $\text{NO}_3$ ) o de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). Existen diferentes factores que influyen en la absorción de este





elemento en la planta, tales como: tipo de planta, la intensidad lumínica y la presencia de nitrógeno en el medio (Marschner, 2011).

#### **1.2.1.1.2 Fósforo**

Este elemento se encuentra en el extracto seco de las plantas en un porcentaje del 0,1 a 0,4 %. El fósforo participa en el proceso de fotosíntesis y en otros procesos químico – fisiológicos como la respiración y el crecimiento celular (Dirección de fomento de tierras y aguas, 2002; León F., Viteri D., & Cevallos A., 2004).

El fósforo se absorbe mayormente como anión monovalente fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), que como anión divalente ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) (M. Rodríguez & Flórez, 2004).

#### **1.2.1.1.3 Potasio**

El potasio, se encuentra del 1 a 4 % en el extracto seco de las plantas. Este elemento está involucrado en la síntesis de proteínas y carbohidratos, además incrementa la resistencia de las plantas a las sequías, heladas y salinidad (Dirección de fomento de tierras y aguas, 2002; Prendes et al., 2006). Este elemento se absorbe en las plantas en forma de iones monovalentes ( $\text{K}^+$ ) (M. Rodríguez & Flórez, 2004).

### **1.2.1.2 NUTRIENTES SECUNDARIOS**

#### **1.2.1.2.1 Calcio**

El calcio es un elemento fundamental para el crecimiento radicular y del tubo polínico, también es un constituyente importante de las membranas celulares, ya que regula su permeabilidad, evitando en algunos casos el ataque de hongos a los tejidos (Marschner, 2011; M. Rodríguez & Flórez, 2004).

#### **1.2.1.2.2 Magnesio**

El magnesio es un componente esencial de la clorofila, es por ello que aproximadamente de un 15 a un 20% de magnesio se localiza en las partes verdes de la planta como las hojas. Además, el magnesio interviene principalmente en las reacciones enzimáticas relacionadas con la transferencia de energía (Marschner, 2011). Este elemento se absorbe como catión



divalente ( $Mg^{2+}$ ), su absorción en las plantas puede disminuir al tener relaciones de Ca/Mg elevadas (M. Rodríguez & Flórez, 2004).

#### **1.2.1.2.3 Azufre**

El azufre forma parte esencial de proteínas, vitaminas tales como la biotina y tiamina, y de algunas enzimas. También, se le relaciona a este elemento con la formación de la clorofila (M. Rodríguez & Flórez, 2004); la mayoría de plantas disponen de un 0,2 a un 0,3% de este elemento en su extracto seco (Dirección de fomento de tierras y aguas, 2002).

### **1.2.2 MICRONUTRIENTES**

Según, Welch & Shuman (1995), se consideran como micronutrientes a aquellos elementos que son requeridos por los tejidos vegetales en concentraciones inferiores a 100  $\mu g/g$  (masa seca). Estos elementos son: boro, cloro, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, níquel y zinc. Es importante mencionar que, existen otros elementos considerados como esenciales para ciertas especies de plantas cultivadas en condiciones ambientales específicas. Por ejemplo el cobalto (Co) es indispensable en el proceso de fijación del nitrógeno de las leguminosas (M. Rodríguez & Flórez, 2004; Welch & Shuman, 1995).

## **1.3 NITRÓGENO EN EL SUELO**

La naturaleza dispone de dos fuentes primordiales de reserva de nitrógeno para las plantas, la primera es el aire atmosférico, el cual posee un 78 % de nitrógeno en estado molecular ( $N_2$ ), aunque también existen otras formas gaseosas, pero menor cantidad como: óxido nitroso ( $N_2O$ ), óxido nítrico (NO), dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ) y el amoníaco ( $NH_3$ ). Otra reserva significativa de nitrógeno es la materia orgánica del suelo, pues se sabe que del total de nitrógeno que existe en el suelo, aproximadamente de un 90 a un 95 % se encuentra formando compuestos orgánicos (Celaya & Castellanos, 2011). Sin embargo, las formas orgánicas de nitrógeno no pueden ser asimiladas directamente por las plantas, sino que deben transformarse a formas inorgánicas.



El nitrógeno inorgánico que puede ser absorbido, se encuentra como nitrato y amonio; ambos constituyen el 2% del nitrógeno total en el suelo (Celaya & Castellanos, 2011; Perdomo, s/f).

Por lo tanto, la presencia de nitrógeno en el suelo, se debe a procesos de descomposición de diferentes compuestos orgánicos nitrogenados de origen animal o vegetal (materia orgánica), a la fijación del nitrógeno atmosférico, gracias a la intervención de microorganismos específicos y en menor cantidad, debido a fenómenos físicos (Blaya & García, 2003; Gamboa Jaimes, 1971). A continuación, se detallará las formas de fijación del nitrógeno en el suelo.

### **1.3.1 FIJACIÓN DEL NITRÓGENO ATMOSFÉRICO**

El nitrógeno procedente de la atmósfera terrestre se fija mediante:

#### **1.3.1.1 FIJACIÓN ATMOSFÉRICA**

El nitrógeno de esta forma es fijado en mínimas cantidades que bordean alrededor del 0,5% del total del nitrógeno fijado en el suelo. Esta fijación se da gracias a fenómenos físicos como las descargas eléctricas, mismas que proveen de energía necesaria para que el nitrógeno ( $N_2$ ) reaccione con el oxígeno presente en el aire o con el hidrógeno del agua contenido en la atmósfera, formándose de este modo diferentes compuestos, que son luego transportados al suelo mediante la lluvia (Fassbender, 1984; Prendes et al., 2006).

#### **1.3.1.2 FIJACIÓN BIOLÓGICA**

En este caso, la fijación del  $N_2$  atmosférico se da gracias a presencia de ciertos géneros bacterianos (Prendes et al., 2006). A su vez, la fijación biológica se divide en dos tipos: *la fijación asimbiótica y la fijación simbiótica*.

- **Fijación asimbiótica:** es realizada por microorganismos que habitan independientemente, ya sea en el agua o en el suelo; los mismos pueden ser géneros de bacterias heterótrofas aerobias o anaerobias (Prendes et al., 2006).



- **Fijación simbiótica:** es realizada por microorganismos que forman asociaciones simbióticas con otros organismos superiores como las plantas, un ejemplo de ello es la fijación simbiótica de las leguminosas (porotos, arvejas, etc.), mismas que poseen nódulos en sus raíces originadas por la presencia de bacterias del género *Rhizobium*, en estos nódulos, es donde ocurre la fijación del nitrógeno presente en la atmósfera (Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 1995; Prendes et al., 2006).

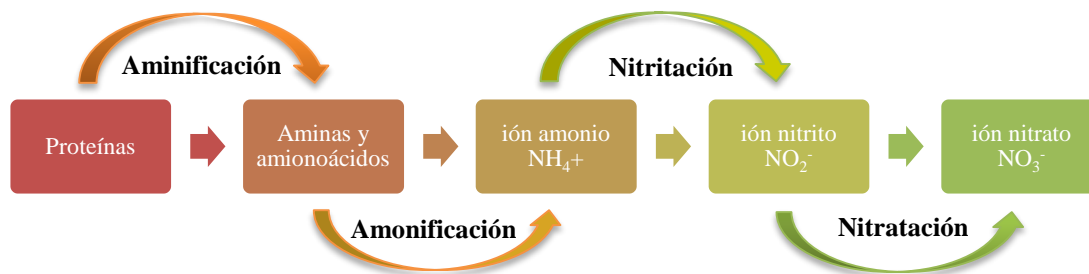
Es importante mencionar que, todos los microorganismos que actúan como fijadores de nitrógeno atmosférico poseen la enzima nitrogenasa, la cual es la encargada de regular el proceso de fijación y de transformar el nitrógeno atmosférico en amoníaco (Fassbender, 1984).

### 1.3.2 MINERALIZACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA

El proceso de mineralización de las formas orgánicas o denominadas como mineralizables, se efectúa en tres etapas: **aminificación, amonificación y nitrificación**. A continuación se detallan las etapas (Fassbender, 1983; Prendes et al., 2006).

- **Aminificación:** consiste en la transformación de las proteínas presentes en la materia orgánica en aminas y aminoácidos.
- **Amonificación:** las aminas y aminoácidos de la etapa anterior se transforman en compuestos amoniacales.
- **Nitrificación:** Los compuestos amoniacales son oxidados, transformándose en compuestos nítricos. A su vez, este proceso se divide en dos etapas:
  - *Nitritación:* El nitrógeno amoniacal se oxida a nitrito mediante la intervención de nitrosobacterias.
  - *Nitratación:* El nitrito de la etapa anterior es oxidado a nitrato, debido a la presencia de nitrobacterias.

A continuación, se muestra un esquema del proceso de mineralización de la materia orgánica.



*Figura 1. Proceso de mineralización de la materia orgánica*

*Fuente: Elaboración Propia*

Las etapas de aminificación y amonificación son importantes y predominantes en el proceso de mineralización de la materia orgánica en los casos más desfavorables, en medios ácidos y con aireación insuficiente (Prendes et al., 2006).

Por el contrario, la etapa de nitrificación del amonio, es posible en medios con aireación suficiente; ya que, se debe disponer del oxígeno necesario para que se dé la oxidación del  $\text{NH}_4^+$ , además, es necesaria una humedad del 12 al 18 % (Fassbender, 1984; Prendes et al., 2006).

### **1.3.3 NITRÓGENO AMONIAL**

Según, Prendes et al. (2006), el nitrógeno amoniacal puede tener diferentes destinos:

- Una gran proporción es empleada por microorganismos degradadores para la síntesis de sus proteínas, este proceso se conoce como reorganización o inmovilización del nitrógeno, de este modo, el nitrógeno amoniacal no podrá ser empleado por las plantas; más sin embargo, cuando estos microorganismos mueran este nitrógeno es recuperado.
- Es absorbida por los coloides en el suelo o se fija en algunas arcillas en una forma que no puede ser utilizada por las plantas.
- Es absorbido por las plantas de forma paulatina.
- Es oxidado a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) mediante procesos de nitrificación.
- Se disipa o volatiliza en la atmósfera en forma de amoníaco ( $\text{NH}_3$ ).

### 1.3.4 NITRÓGENO NÍTRICO

El nitrógeno nítrico al igual que el nitrógeno amoniacal tiene diferentes destinos:

- Una parte, es empleada por microorganismos nitrificantes para obtener su proteína, este nitrógeno, también se recupera cuando mueren estos microorganismos.
- Es absorbido por las plantas.
- Se pierde por lixiviación, pasando a las capas más profundas del suelo y por ende, este nutriente se encontrará fuera del alcance de las raíces.
- Se disipa en la atmósfera al formarse compuestos gaseosos, lo que se conoce como desnitrificación, lo cual se debe a condiciones de escasez de oxígeno, por lo tanto ciertos microorganismos reducen el nitrato a NO, N<sub>2</sub>O y N<sub>2</sub>.

### 1.3.5 CICLO DEL NITRÓGENO EN EL SUELO

El ciclo del nitrógeno, es el resultado de la serie de procesos explicados anteriormente, los cuales continuación se muestran en la Figura 2.

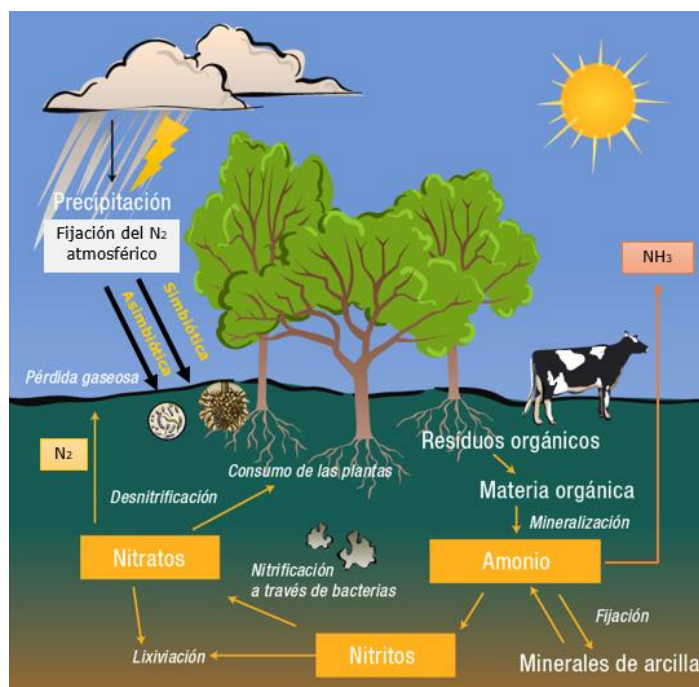


Figura 2. Ciclo del nitrógeno en el suelo

**Fuente:** (University Corporation for Atmospheric Research (UCAR), 2015)



## **1.4 FÓSFORO EN EL SUELO**

El fósforo total presente en la capa del suelo arable, de manera general oscila alrededor de los 200 a 500 ppm; sin embargo, de este total menos del 1% se encuentra disponible para las plantas. El horizonte o capa superficial del suelo al contener generalmente hojas, ramas o restos vegetales, suele considerarse como un depósito de fósforo orgánico (C. B. Rodríguez, 2008), el cual por diversos procesos se revierte hacia formas inorgánicas; es por ello que, la capa superficial muchas veces se considera más rica en fósforo inorgánico que la roca madre misma. La disolución del suelo, posee cantidades pequeñas de fósforo disponible para la planta; sin embargo, conforme pasa el tiempo estas se vuelven insuficientes. Los procesos de desorción, mineralización y solubilización permiten que el fósforo sea disponible para las plantas en diferentes formas (Khoury, 2005).

### **1.4.1 FIJACIÓN DEL FÓSFORO EN EL SUELO**

La fijación del fósforo hace referencia, al proceso en el que los compuestos fosfatados presentes en el suelo, son retenidos en el mismo en formas insolubles, volviéndose por lo tanto, no disponibles para las plantas (Khoury, 2005; Rojas Ozuna, 2013).

La fijación del fósforo puede deberse a un proceso de adsorción o precipitación, considerándose la primera como una fijación débil y la segunda como una fijación fuerte, en la cual el fósforo reacciona químicamente con otros compuestos presentes en el suelo, formándose compuestos insolubles (Khoury, 2005). El fósforo es fijado en los suelos ácidos, al reaccionar con óxidos e hidróxidos de hierro y aluminio, formando fosfatos insolubles; por otro lado, en suelos alcalinos el fósforo reacciona con el calcio, formando compuestos insolubles. También puede darse una fijación con las arcillas (Rojas Ozuna, 2013).

### **1.4.2 FORMAS ASIMILABLES DE FÓSFORO**

El fósforo es asimilado por las plantas, únicamente cuando se encuentra en forma de iones  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Sin embargo, el mayor o menor aprovechamiento del fósforo en estas formas, va a depender básicamente del pH del suelo y de la presencia de otros iones como el calcio, aluminio y hierro (Prendes et al., 2006). En el caso del pH, M. Rodríguez & Flórez (2004), indican que si el pH se encuentra de 4,5 a 7,0, predominará el anión  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$

y por el contrario, si el pH es básico, predominará el anión  $\text{HPO}_4^{-2}$ ; cabe mencionar que un pH dentro del rango alcalino va limitar la disponibilidad del fósforo, debido a la formación de fosfatos de calcio y de igual forma, si se tienen condiciones de pH menores a 4,5; existe el riesgo de que el fósforo precipite en forma de fosfatos de aluminio y fosfatos de hierro (Prendes et al., 2006) .

El fósforo en el suelo se clasifica en: *fósforo orgánico* y *fósforo inorgánico* (Prendes et al., 2006).

- **Fósforo orgánico:** representa del 40 al 80 % del fósforo total en el suelo.
- **Fósforo inorgánico:** se encuentra como reserva en la roca madre, al descomponerse la misma a largo plazo. El fósforo inorgánico a su vez se clasifica en:
  - **Fosfatos de calcio:** el fosfato tricálcico es insoluble y por lo tanto no es asimilable por las plantas; por el contrario el fosfato monocálcico y bicálcico son solubles y asimilables, pero se encuentran en mínimas cantidades.
  - **Fosfatos de hierro y aluminio:** son muy insolubles y estables en suelos ácidos.

### 1.4.3 CICLO DEL FÓSFORO EN EL SUELO

En la Figura 3, se muestra la dinámica del fósforo en el suelo.

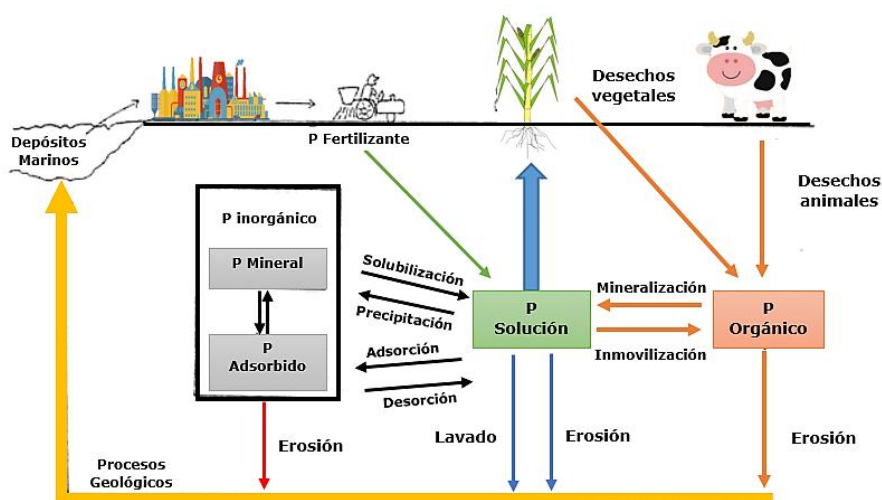


Figura 3. Ciclo del fósforo en el suelo  
Fuente: (Prendes et al., 2006)





El fósforo disponible es el resultado de una serie de procesos en los cuales se gana y pierde fósforo (Prendes et al., 2006):

***Ganancias:***

- Mineralización de la materia orgánica.
- Meteorización de los minerales en el suelo.
- Adición de abonos.

***Pérdidas:***

- Extracción del fósforo por parte de las plantas y de los microorganismos. El fósforo en este caso queda inmovilizado por un tiempo, hasta que sea restituido al suelo mediante los residuos orgánicos.
- Insolubilización del fósforo, al formarse algunos compuestos, en este caso una parte del fósforo insoluble generalmente es recuperado para las plantas.
- Pérdidas pequeñas por arrastre con el agua.
- El fósforo de la capa superficial se pierde también por erosión.

## **1.5 ANÁLISIS QUÍMICOS DE LOS SUELOS**

Los análisis químicos de suelos, generalmente se realizan con el fin de conocer o estimar las formas disponibles o extractables de los nutrientes contenidos en el suelo y en base a los resultados obtenidos, se define la cantidad de nutrientes a aplicar o el programa de fertilización a emplear. Es importante mencionar que, la cantidad de nutriente que se extrae del suelo, indica una proporción del total del nutriente presente en el suelo. Además, la cantidad de nutriente que se extrae, no es igual a la cantidad nutriente que absorbe el suelo; sin embargo, está muy relacionada con la misma. El término “disponible” hace referencia a la cantidad de nutriente que se encuentra en equilibrio rápido con la solución del suelo (Correndo & García, 2017).

### **1.5.1 SOLUCIONES QUÍMICAS EXTRACTORAS**

Las soluciones químicas extractoras, simulan la acción de la raíz; es decir extraen en solución, una cantidad de nutrientes similar a la que la planta tomaría normalmente en su ciclo de crecimiento (Correndo & García, 2017). Es importante mencionar que, las



soluciones extractantes, dan valores de disponibilidad de los nutrientes; además, no existe una solución extractante universal; sino que cada extractante es adecuado para un determinado grupo de suelos (Khouri, 2005).

## **1.6 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO AMONICAL EN SUELO**

A continuación, se describirán de manera breve los métodos empleados para la determinación de nitrógeno amoniacal en suelo.

### **1.6.1 MÉTODO DE KJELDAHL**

Según, Bremner & Keeney (1965), se emplea como solución extractante del  $\text{N-NH}_4^+$  en el suelo  $\text{KCl}$  2 N. Con el extracto obtenido, se determina el nitrógeno amoniacal por destilación con arrastre de vapor (Destilación Kjeldahl) en presencia de  $\text{MgO}$  (Moyano & Gallardo, 1986) y posteriormente, el destilado se recoge en una solución de ácido bórico con indicador, para que luego, sea titulado con ácido sulfúrico 0,005 N. Se emplea el  $\text{KCl}$  2 N como extractante, ya que este reactivo es capaz de extraer el amonio intercambiable. Es importante mencionar que, este reactivo, puede provocar volatilización del amoníaco durante la extracción, si el suelo que se analiza es alcalino (Álvarez Sánchez & Marín Campos, 2011).

A continuación, se presenta el procedimiento según (Álvarez Sánchez & Marín Campos, 2011)

- 1) Pesar 5 g de suelo y agregar 50 mL de solución de  $\text{KCl}$  2 N.
- 2) Agitar durante 60 minutos a velocidad media (180 rpm) y filtrar.
- 3) Colocar 10 mL del filtrado en un matraz Kjeldahl y agregar 0,2 g de  $\text{MgO}$  calcinado.
- 4) Destilar durante 3 o 4 minutos y recoger el destilado en 10 mL de solución de ácido bórico con indicador.
- 5) Titular el destilado empleando ácido sulfúrico 0,005 N.
- 6) Repetir el procedimiento empleando como blanco 10 mL de  $\text{KCl}$  2N.

Los resultados se expresan como  $\text{mg de N kg}^{-1}$  de suelo.



### **1.6.2 DETERMINACIÓN MEDIANTE EL USO DE UN ELECTRODO DE IÓN SELECTIVO**

El funcionamiento del electrodo de ión selectivo (EIS) se basa en la respuesta selectiva que da este, frente a una especie presente en una solución. Los mismos están provistos por una membrana que permite la separación de la muestra a analizar y el interior del electrodo. El electrodo contiene una solución con el ión de interés. La parte externa que está en contacto con la muestra de estudio y la diferencia de potencial en la membrana van a depender de la diferencia en la actividad de la especie del analito entre la solución interna y la muestra de estudio (Pulgarín, 2005).

El procedimiento dado según Pulgarín (2005) es el siguiente:

- 1) Colocar 100 mL de una solución de KCl 1 N a 10 g de suelo.
- 2) Agitar durante 10 min y filtrar
- 3) Tomar del filtrado del suelo una alícuota de 50 mL para la determinación de amonio por el método del electrodo de ión selectivo.

### **1.6.3 MÉTODO DE OLSEN MODIFICADO**

Según Pulgarín (2005), la determinación del nitrógeno amoniacal en los suelos empleando determinaciones espectrofotométricas Uv-Vis, se basan en la formación de complejos coloreados con la presencia del ión  $\text{NH}_4^+$ . La intensidad de color desarrollada a una longitud de onda dada, es comparada con la de otras soluciones de concentración conocida o soluciones estándar (soluciones que contienen la misma especie absorbente en estudio); de esta forma se determina la concentración de la muestra problema; en este caso una muestra de suelo de concentración desconocida (Skoog, Holler, & Crouch, 2008).

El objetivo de este método, al igual que los anteriormente mencionados, es cuantificar el nitrógeno amoniacal disponible para las plantas presente en el suelo (Banegas Sanmartín, 2014). Este método es el escogido para la validación, debido a que en la Facultad de Ciencias Químicas se dispone del espectrofotómetro Uv –Vis, de los reactivos, por la facilidad de analizar varias muestras en función del factor tiempo. Los detalles acerca de este método se encuentran en la metodología.



## **1.7 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE FÓSFORO DISPONIBLE EN SUELO**

A continuación, se presentan brevemente los métodos utilizados para la determinación de fósforo disponible en el suelo para las plantas.

### **1.7.1 MÉTODO DE BRAY I**

Este método desarrollado por Bray y Kurtz en 1965, emplea como extractante una solución de fluoruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{F}$ ) 0,03 N y ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ ) 0,025 N, el cual se basa en que, los iones ( $\text{H}^+$ ) actúan como solubilizadores del fósforo en el suelo y la capacidad del ión ( $\text{F}^-$ ) para evitar interferencias con los iones  $\text{Al}^{+3}$  y  $\text{Fe}^{+3}$  (Boschetti & Quintero, 2003).

El procedimiento según Cáseres Rueda (1973) es el siguiente:

- 1) Pesar 2 g de suelo (secado al aire).
- 2) Colocar 14 mL de la solución extractante y agitar por 1 min.
- 3) Filtrar y determinar el fósforo por el método del azul cloromolíbido.

### **1.7.2 MÉTODO CAROLINA DEL NORTE**

Este método determina el fósforo, empleando el método del molibdovanadato de amonio, previo a la extracción en 5 g de suelo, empleando 50 mL de una solución extractante de ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ ) 0,05 N y ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 0,025 N (Cáseres Rueda, 1973).

El método del molibdovanadato de amonio, consiste en la formación del color amarillo vanadomolibdofosfórico, tras añadirse una solución de vanadato de amonio al 0,25 % en ácido nítrico 1 N y una solución de molibdato de amonio al 5 %, en el extracto de suelo (Carrasquero & Adams, 2011).

### **1.7.3 MÉTODO PEECH MORGAN**

En este método de extracción del fósforo asimilable o disponible, se emplea como solución extractante 50 mL de una solución de acetato de sodio al 10 % y ácido acético al 3% previamente ajustado a un pH de 4,8; para que sea aplicada a 10 g de suelo, más la adición de 0,5 g de carbón activado (libre de fósforo). El tiempo de contacto de la solución extractante y el suelo es de 30 minutos; transcurrido este tiempo, se filtra y en el filtrado se



determina el fósforo disponible para las plantas empleando el método de azul de molibdeno (Cáseres Rueda, 1973).

#### **1.7.4 MÉTODO DE OLSEN MODIFICADO**

Este método de determinación del fósforo disponible en el suelo para las plantas, fue propuesto por Díaz Romeu & Hunter (1978) y su principio de manera general, consiste en medir la intensidad de color del complejo azul de fosfomolibdato, mediante espectrofotometría Uv- Vis (Banegas Sanmartín, 2014). Y al igual que, en la determinación del nitrógeno amoniacal por el método de Olsen, dicha intensidad de color desarrollada a una longitud de onda específica, es comparada con la de soluciones estándar determinándose así la concentración de la muestra de interés (Skoog et al., 2008).

Este método también fue escogido, debido a que se dispone de un espectrofotómetro Uv – Vis, de los reactivos, porque autores como Khouri (2005), mencionan que con este método se pueden analizar muestras de suelos con rapidez, facilidad, siendo el método reproducible. Los detalles acerca de este método se encuentran en la metodología.

#### **1.8 ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN UV-VISIBLE**

La espectroscopía de absorción UV-Visible se fundamenta en la absorción de radiación electromagnética de un analito en la zona ultravioleta y visible (Gallego Picó, Garcinuño Martínez, & Morcillo Ortega, 2013). En otras palabras, consiste en medir la intensidad de color de un analito en estudio a una longitud de onda dada, comparándola con soluciones estándar que posean la misma especie en estudio (Skoog et al., 2008).

Los espectrofotómetros son los equipos que permiten medir la absorción de la radiación de un analito presente en una disolución (Gallego Picó et al., 2013). En este trabajo de titulación se empleará un espectrofotómetro de haz simple (un solo haz de luz), en el cual, la radiación en este caso, procede de una fuente continua, la cual atraviesa un monocromador, mismo que actúa como un filtro óptico que transmite un haz de luz con una longitud de onda e intensidad determinada (radiación monocromática), posteriormente, la radiación monocromática atraviesa la disolución de la muestra en estudio, la cual está contenida en una cubeta plástica de determinada longitud; la radiación saliente que no se

absorbe, es medida mediante un detector y por medio de un transductor se entrega la medida en unidades de absorbancia (Gallego Picó et al., 2013; Skoog et al., 2008). Todo lo anteriormente descrito, se basa en la ley de Beer, que menciona que al tener una especie absorbente contenida en una celda de longitud constante, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de dicha especie (Skoog et al., 2008).

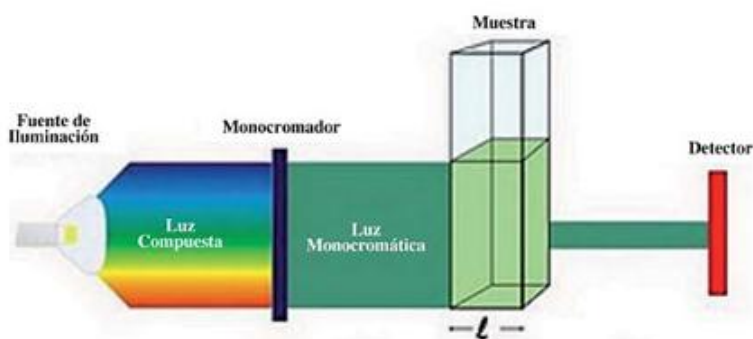


Figura 4. Esquema de un espectrofotómetro UV – Vis de haz simple

*Fuente:* (Gallego Picó et al., 2013)

## 1.9 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Según Eurolab España et al. (2016), la validación de los métodos analíticos es importante, pues permite que se demuestre con evidencia objetiva que un método es idóneo para el uso o una aplicación analítica prevista. El VIM (Vocabulario Internacional de Metrología) en cambio define a la validación como la “*Verificación, donde los requisitos especificados son adecuados para el uso previsto*” (Comité conjunto para las guías en metrologías, 2012).

Esta definición, aplicándola en el campo de análisis de suelos, validar los métodos consiste en demostrar mediante una serie de experimentos que los métodos propuestos son idóneos para la aplicación analítica prevista, para ello los métodos propuestos deberán cumplir con ciertos parámetros de desempeño planteados previamente como en el caso de estudio (Guía Eurachem, 2016; Hernández Revilla, 2013).

### 1.9.1 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DE LOS MÉTODOS

A continuación, se detallarán los parámetros o características de desempeño seleccionados para la validación en el estudio.

### **1.9.1.1 INTERVALO DE TRABAJO**

Se define como intervalo de trabajo, a aquel intervalo en el cual el método provee de resultados con una incertidumbre tolerable (Guía Eurachem, 2016). El Comité conjunto para las guías en metrologías (2012), lo considera como aquel intervalo en el que se ha confirmado que el analito en estudio es cuantificado satisfactoriamente con una adecuada precisión, exactitud y linealidad. Dentro del intervalo de trabajo, existe un extremo inferior y un extremo superior; en el extremo inferior del intervalo de concentraciones, el factor limitante es el límite de cuantificación (*LOQ*), mientras que en el extremo superior del intervalo de concentraciones, las limitaciones están en función del alcance de la respuesta del instrumento o de condiciones analíticas óptimas (Comité conjunto para las guías en metrologías, 2012; Guía Eurachem, 2016).

### **1.9.1.2 LINEALIDAD**

La linealidad se define como la capacidad de un método analítico, para proveer de resultados que sean directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra, pero dentro de un intervalo específico o determinado de trabajo (Arias Giraldo, 2014; Montoya Corrales & Montoya Corrales, 2012).

Dentro del estudio de la linealidad, en el caso de estudio se obtendrán datos, en donde se relacionará la concentración de los patrones (*x*) con la absorbancia que presentan los mismos (*y*). Esta relación puede expresarse matemáticamente como una recta de regresión lineal de la siguiente forma:

$$y = bx \pm a \quad (1)$$

Donde, **y** es la Absorbancia, **a** el intercepto, **b** la pendiente y **x** es la concentración. El coeficiente de correlación (**r**), va a indicar el grado de relación entre la concentración y la absorbancia. Cuando existe una correlación con alta probabilidad **r** toma valores cercanos a 1, siendo la unidad el máximo valor a tomar, mientras que valores cercanos a cero indican lo contrario. Sin embargo, el coeficiente de determinación (**r**<sup>2</sup>) es el más utilizado, el cual, indica la proporción de la varianza total de **y** que se explica por el modelo de mínimos



cuadrados. El mismo puede expresarse en porcentaje y cuanto más próximo del valor de 1 se encuentra el  $r^2$ , mejor es la representación del modelo matemático, expresado por la ecuación de la recta (Arias Giraldo, 2014).

#### 1.9.1.3 LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD)

El límite de detección, se define como la concentración más baja de analito que se logra detectar mediante un método determinado (Guía Eurachem, 2016), sin embargo no se cuantifica necesariamente bajo las condiciones experimentales dadas (Vega Rodríguez, 2011). Según, Skoog et al. (2001) el límite de detección depende de la relación que existe entre la magnitud de la señal analítica y el valor de las fluctuaciones estadísticas de la señal del blanco. Por lo tanto, esta mínima señal analítica distinguible ( $S_{m,LOD}$ ), es igual a la suma de la señal media del blanco ( $\bar{S}_{bl}$ ), más un múltiplo  $k$  de la desviación estándar del mismo. En este estudio, el múltiplo  $k$  tomará el valor de 3 para el cálculo del límite de detección, de acuerdo a recomendaciones tomadas de la Guía Eurachem (2016) y Skoog et al. (2001). Lo anteriormente citado, se expresa de la siguiente forma:

$$S_{m,LOD} = \bar{S}_{bl} + 3 \cdot s_{bl} \quad (2)$$

Donde:

$S_{m,LOD}$  = Mínima señal analítica distinguible.

$\bar{S}_{bl}$  = Señal media o promedio de la serie de medidas replicadas del blanco.

$s_{bl}$  = Desviación estándar de las medidas del blanco.

#### 1.9.1.4 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ)

El límite de cuantificación, es la concentración más baja de analito que puede ser determinada o cuantificada, bajo condiciones de desempeño aceptables como precisión y veracidad (Guía Eurachem, 2016; Vega Rodríguez, 2011). Esta mínima señal analítica cuantificable ( $S_{m,LOQ}$ ), es igual a la suma de la señal media del blanco ( $\bar{S}_{bl}$ ), más un múltiplo  $k$  de la desviación estándar del mismo. Para el cálculo del límite de cuantificación,





el múltiplo  $k$  tomará el valor de 10, factor propuesto por la IUPAC (Hernández Revilla, 2013; Skoog et al., 2001). Lo anteriormente mencionado, se expresa de la siguiente forma:

$$S_{m,LOQ} = \bar{S}_{bl} + 10 \cdot s_{bl} \quad (3)$$

Donde:

$S_{m,LOQ}$  = Mínima señal analítica cuantificable.

$\bar{S}_{bl}$  = Señal media o promedio de la serie de medidas replicadas del blanco.

$s_{bl}$  = Desviación estándar de las medidas del blanco.

De acuerdo a lo propuesto por Skoog et al. (2001), para calcular el límite de detección y el límite de cuantificación como concentración se deberán emplear las siguientes ecuaciones:

$$C_{m,LOD} = \frac{S_{m,LOD} - \bar{S}_{bl}}{m} \quad (4)$$

$$C_{m,LOQ} = \frac{S_{m,LOQ} - \bar{S}_{bl}}{m} \quad (5)$$

Donde:

$S_{m,LOD}$  = Mínima señal analítica distinguible.

$S_{m,LOQ}$  = Mínima señal analítica cuantificable.

$\bar{S}_{bl}$  = Señal media o promedio de la serie de medidas replicadas del blanco.

$m$  = Pendiente de la curva de calibración, empleada para el análisis de las medidas replicadas del blanco.

#### 1.9.1.5 EXACTITUD

La exactitud de una medida, hace referencia a la proximidad que existe entre un valor medido y un valor de referencia considerado como el valor verdadero (Comité conjunto para las guías en metrologías, 2012). En los procesos de validación, la exactitud se analiza dividiéndola en dos componentes: *veracidad* y *precisión* (Guía Eurachem, 2016).

Según el VIM (Vocabulario Internacional de Metrología), la veracidad hace referencia a la proximidad de la media de un número infinito de resultados obtenidos con el método a



validar y el valor de referencia (Comité conjunto para las guías en metrologías, 2012). Como resulta prácticamente imposible realizar un número infinito de mediciones, por lo tanto, la veracidad es expresada cuantitativamente en términos de sesgo, parámetro que se determina comparando la media de los resultados obtenidos con el método empleado con un valor de referencia apropiado (Guía Eurachem, 2016).

Según la Guía Eurachem (2016), el sesgo se podrá calcular de la siguiente forma:

$$b = \bar{x} - x_{ref} \quad (6)$$

$$b (\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \cdot 100 \quad (7)$$

$$R (\%) = \frac{\bar{x}}{x_{ref}} \cdot 100 \quad (8)$$

Donde:

$b$  = Sesgo.

$\bar{x}$  = Promedio del conjunto de resultados obtenidos.

$x_{ref}$  = Valor de referencia aceptado.

$b (\%)$  = Sesgo relativo en porcentaje.

$R (\%)$  = Recuperación relativa en porcentaje o recuperación aparente.

#### **1.9.1.6 PRECISIÓN**

La precisión de una medida, indica la proximidad existente entre los valores medidos, al realizarse mediciones repetidas en condiciones específicas (Comité conjunto para las guías en metrologías, 2012). La Eurolab España et al. (2016), define a la precisión de una medida como una medida indicativa de que tan cerca están los resultados obtenidos entre sí. La precisión puede estimarse empleando medidas de dispersión como la desviación estándar, la varianza o con el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) (Comité conjunto para las guías en metrologías, 2012). A continuación se presentan las



ecuaciones que definen las medidas de dispersión antes mencionadas (Hernández Revilla, 2013):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (9)$$

$$C.V = \frac{s}{\bar{x}} \quad (10)$$

$$C.V (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (11)$$

Donde:

$s$  = Desviación estándar o desviación típica.

$x_i$  = Valor medido.

$\bar{x}$  = Promedio de las mediciones.

$n$  = Número de mediciones o datos obtenidos.

$C.V$  = Coeficiente de variación o desviación estándar relativa (D.E.R).

$C.V (\%)$  = Coeficiente de variación porcentual.

La varianza es el resultado de elevar al cuadrado la desviación estándar ( $s^2$ ) (Hernández Revilla, 2013).

La precisión a su vez, es representada por dos medidas: *la repetibilidad* y *la reproductibilidad*.

#### **1.9.1.7 REPETIBILIDAD**

La repetibilidad puede definirse como la precisión que se obtiene al analizarse una misma muestra un determinado número de veces, en un corto período de tiempo, utilizando el mismo equipo de medida, reactivos y llevado a cabo por el mismo analista (Guía Eurachem, 2016).



### **1.9.1.8 REPRODUCTIBILIDAD**

La reproductibilidad puede definirse como una medida de la variabilidad de los resultados obtenidos entre laboratorios, empleando un mismo método de análisis, pero empleando analistas y equipos distintos en un lapso de tiempo largo (Guía Eurachem, 2016). El VIM, define la reproductibilidad de una medida como la precisión de medida obtenida en condiciones de reproductibilidad (Comité conjunto para las guías en metrologías, 2012).

### **1.9.1.9 PRECISIÓN INTERMEDIA (REPRODUCTIBILIDAD DENTRO DEL LABORATORIO)**

La Guía Eurachem (2016), también menciona a la "*Precisión intermedia*", como aquel parámetro que permite estimar la variación de los resultados de una serie de análisis efectuados con un mismo método en un mismo laboratorio; pero empleando condiciones operativas que varíen mayormente, en comparación con las condiciones de repetibilidad, como por ejemplo: diferentes días, analistas, aparatos, etc.

La precisión intermedia, también suele conocerse como: "*la reproductibilidad dentro de un laboratorio*" (Guía Eurachem, 2016).

## **2 METODOLOGÍA**

### **2.1 MUESTREO DEL SUELO**

#### **2.1.1 OBJETO**

El objetivo del muestreo de suelos es obtener una porción (muestra de suelo) que sea homogénea y representativa, para que mediante distintos análisis físico químicos se pueda obtener información de la totalidad de un terreno (Agrocalidad, 2018; Padilla G., 1973).

#### **2.1.2 UBICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LA ZONA A MUESTREAR**

Para este trabajo titulación, se seleccionó muestrear en la Granja Integral Municipal San Antonio, ubicada en el cantón Gualaceo, comunidad de San Antonio, Km. 6 vía San Juan, la misma cuenta con un área total de 1,08885 hectáreas.



*Fotografía 1. Granja Integral Municipal San Antonio*  
**Fuente:** (M.I.Municipalidad de Gualaceo, 2015)

### 2.1.3 PREPARACIÓN PREVIA AL MUESTREO DE SUELO

En la Figura 5, se muestra un croquis de la granja en estudio, el terreno fue dividido en 7 zonas:

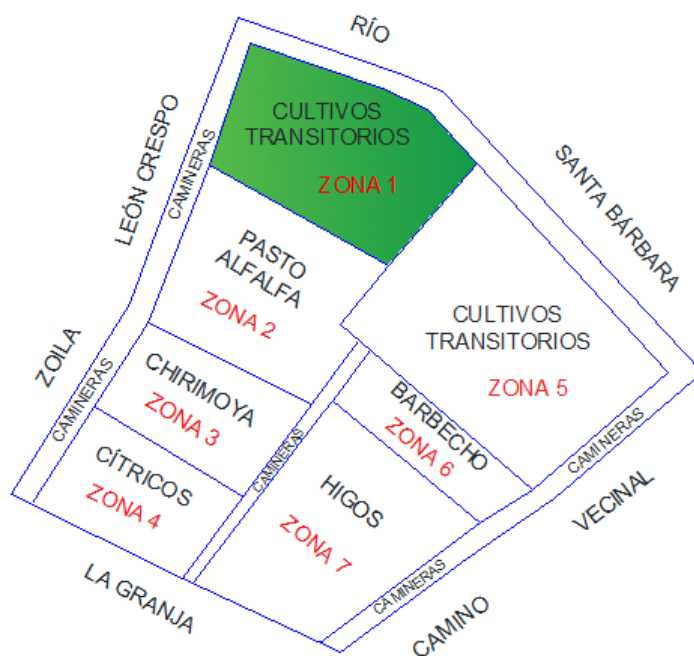


Figura 5. Croquis

**Fuente:** Elaboración Propia

- **Zona 1:** Área seleccionada para el muestreo, la cual posee un área es 2387,13 m<sup>2</sup>. No existían cultivos y según el ingeniero encargado, no se ha sembrado en esa área por más de un año; sin embargo se tiene como precedente que el último cultivo fue alfalfa. Se recorrió el área verificando que presente condiciones semejantes, tales como misma pendiente, que el color y textura del suelo sean las mismas.
- **Zona 2:** Esta área estaba destinada al sembrío de alfalfa.
- **Zona 3:** Esta área se encontraban árboles de chirimoya.
- **Zona 4:** Esta área se encontraban árboles de limón.
- **Zona 5:** Esta zona se encontraba con sembríos de hortalizas.
- **Zona 6:** Barbecho (Zona en la cual no se sembrará durante al menos 2 años).
- **Zona 7:** Esta área tenía árboles de higo.

### 2.1.4 MATERIALES

A continuación en la Tabla 1, se indican los materiales necesarios empleados para realizar el muestreo en el suelo.

*Tabla 1. Materiales necesarios para el muestreo*

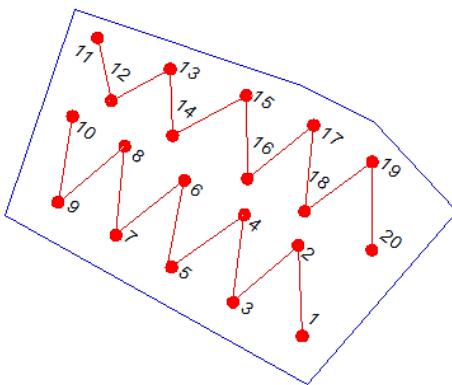
DESCRIPCIÓN
Pala recta
Azadón
Machete
Balde plástico
Fundas plásticas
Libreta
Etiquetas
Cinta adhesiva

*Fuente: (Agrocalidad, 2018)*

### 2.1.5 PROCEDIMIENTO

El procedimiento realizado para la toma de la muestra, está basado según las recomendaciones dadas por Agrocalidad (2018) e INIAP (2008). A continuación, se detalla el mismo:

- 1) Limpiar la superficie de suelo a muestrear.
- 2) Tomar de 20 a 25 submuestras, realizando un recorrido en forma de zig-zag y abarcando todo el terreno. En el caso de estudio se tomaron 20 submuestras.



*Figura 6. Toma de submuestras en forma de zig-zag en la zona de estudio*

*Fuente: Elaboración Propia*

- 3) Cavar un hoyo con las paredes inclinadas, es decir un corte en “V” de una profundidad de aproximadamente 20 cm (capa arable o volumen en el que predominan la mayoría de raíces).

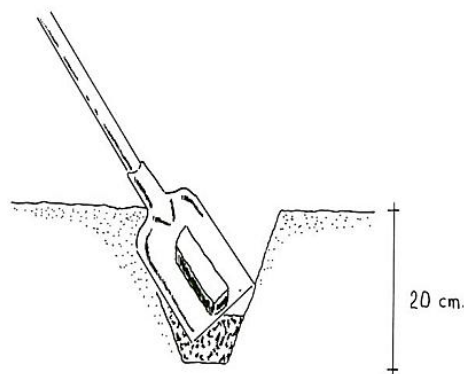


Figura 7. Toma de muestra de suelo (Corte en V)  
**Fuente:** (Agrocalidad, 2018)

- 4) De una de las paredes del hoyo, extraer una tajada de 5 cm de grosor.  
5) Emplear un cuchillo o un machete, descartar los extremos laterales, para obtener así una tajada de 5 cm de ancho.  
6) Colocar las submuestras en un balde plástico y mezclar empleando para ello guantes.  
7) Esparcir las submuestras sobre una lona o papel periódico limpio y realizar el proceso del cuarteo.  
8) Recolectar aproximadamente 1 kilogramo de muestra representativa y colocarla en una funda plástica hermética.

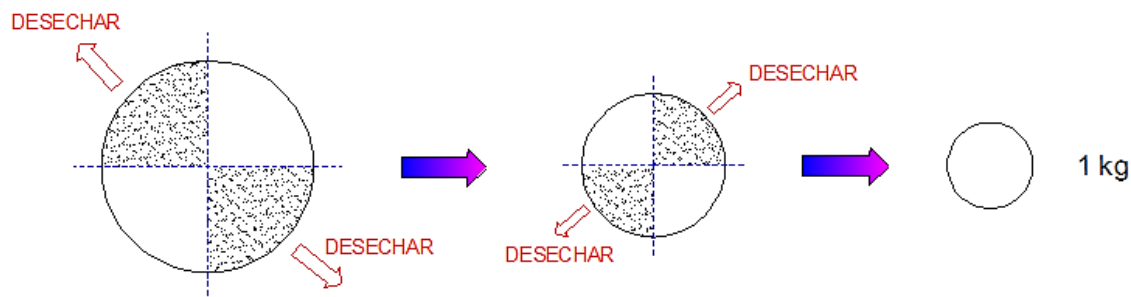


Figura 8. Proceso de cuarteo  
**Fuente:** Elaboración Propia

- 9) Etiquetar la muestra, según lo indicado en el Anexo 1.





### **2.1.6 PRECAUCIONES**

El INIAP (2008), da las siguientes precauciones al momento del muestreo de un suelo:

- No deben mezclarse muestras que sean de distintas áreas de muestreo.
- No se debe tomar muestras provenientes de:
  - Lugares que hayan sido recientemente fertilizados.
  - Que se encuentren al pie de cercas, zanjas o caminos.
  - Zonas donde exista acumulación de estiércol.
  - Donde existan quemas recientes.
  - En zonas pantanosas y donde exista acumulación de sales.

### **2.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS**

A continuación, se indica el procedimiento de la preparación de la muestra según el INIAP, una vez que llega la muestra al laboratorio de análisis de suelos:

- 1) Esparcir la muestra de suelo, ya sea en una bandeja plástica o en papel periódico.
- 2) Disgregar manualmente los pedazos grandes de suelo que se encuentren aglomerados.
- 3) Eliminar residuos de plantas, raíces, piedras y grava gruesa.
- 4) Secar al aire y en la oscuridad.
- 5) Una vez que se encuentre seca la muestra de suelo, moler la muestra y tamizar la misma, empleando para ello un tamiz de 2 mm de abertura o de abertura similar. La fracción de suelo que atraviese el tamiz de 2 mm se homogeniza y será la muestra que se someterá al análisis de nitrógeno amoniacal y fósforo disponible en el suelo.



## 2.2.1 MATERIALES

En la Tabla 2, se muestran los materiales empleados en el proceso de preparación de la muestra de suelo para el análisis.

Tabla 2. Materiales necesarios para la preparación de la muestra de suelo

DESCRIPCIÓN	ESPECIFICACIÓN
Tamiz No. 12 Tyler equivalent 10 Mesh	U.S.A. Standard Testing Sieve A.S.T.M. E-11 Specification <b>Abertura:</b> 1,70 mm o 0,0661 in Fisher Scientific Company
Papel periódico	-----
Mortero	-----

*Fuente: Elaboración Propia*

## 2.3 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN EXTRACTANTE OLSEN MODIFICADA pH 8,5

### 2.3.1 OBJETO

El objetivo de una solución extractora es obtener las formas disponibles de los nutrientes de interés en los suelos, para predecir la disponibilidad de los mismos para las plantas (Banegas Sanmartín, 2014; Chonay Pantzay, 2000).

### 2.3.2 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

#### 2.3.2.1 EQUIPOS

En la Tabla 3, se indican los equipos empleados para la preparación de la solución extractante Olsen modificada pH 8,5.

Tabla 3. Equipos necesarios para la preparación de la solución extractante

DESCRIPCIÓN	MARCA
Balanza analítica	Mettler Toledo
Agitador magnético	Corning
Potenciómetro	Hanna Instruments

*Fuente: Elaboración Propia*

### 2.3.2.2 MATERIALES

La Tabla 4, muestra los materiales empleados en la preparación de la solución extractante Olsen modificada pH 8,5.

*Tabla 4. Materiales empleados para la preparación de la solución extractante*

DESCRIPCIÓN	CAPACIDAD
Erlenmeyer	1 L o 500 mL
Vaso de precipitación	100 mL
Matraz aforado	1 L
Espátula	-----

*Fuente: Elaboración Propia*

### 2.3.2.3 REACTIVOS

La Tabla 5, muestra los reactivos requeridos para la preparación de la solución extractante Olsen modificada pH 8,5.

*Tabla 5. Reactivos necesarios para la preparación de la solución extractante*

DESCRIPCIÓN	FÓRMULA
Bicarbonato de sodio	$\text{NaHCO}_3$
EDTA, Sal disódica dihidratada	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Hidróxido de sodio	$\text{NaOH}$
Ácido clorhídrico fumante	$\text{HCl}$
Agua tipo I	$\text{H}_2\text{O}$

*Fuente: Elaboración Propia*

### 2.3.3 PROCEDIMIENTO

Según Díaz Romeu & Hunter (1978), para preparar 1 litro de solución extractante se deberá seguir los siguientes pasos:

**Solución extractante:**  $\text{NaHCO}_3$  5 N; 0,01 M EDTA, sal disódica dihidratada.

- 1) Pesar 42 g de bicarbonato de sodio y disolver en agua tipo I (añadir alrededor de 400 mL). Agitar empleando un agitador magnético a una velocidad moderada.
- 2) Pesar 3,72 g de EDTA sal disódica dihidratada y disolver en agua Tipo I (añadir alrededor de 400 mL). Agitar empleando un agitador magnético a una velocidad moderada.



- 3) Mezclar cuidadosamente las dos soluciones y agitar empleando el agitador magnético por un tiempo aproximado de 10 min. Posteriormente, trasvasar la solución a un balón de aforo y llevar a un volumen de 1 L empleando agua tipo I.
- 4) Finalmente, corregir el pH de la solución a 8,5; para ello se empleará una solución de hidróxido de sodio 1 N en caso de que los valores del pH estén por debajo del valor de 8,5 o una solución de ácido clorhídrico 1 N en caso de que el valor esté por encima de 8,5.

## **2.4 PROCESO DE VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS**

El proceso de validación para ambos métodos propuestos en este trabajo de titulación se puntualiza de la siguiente forma según la Guía Eurachem (2016) y la Norma ISO 17025 (2005):

- 1) **Establecimiento de la necesidad analítica:** En el laboratorio se establece la necesidad de disponer de un método analítico que satisfaga una demanda determinada. Previo a realizar el trabajo de titulación, se determinó que no existían métodos analíticos validados disponibles en el Laboratorio de suelos, referentes a la determinación de fósforo disponible y nitrógeno amoniacal en suelos. Siendo ambos métodos, usualmente solicitados por clientes en el análisis de suelos, pues estos elementos son considerados como macronutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas.
- 2) **Elección del método y borrador del procedimiento:** En este punto se debe revisar los métodos disponibles y se debe elegir el más adecuado. Los métodos seleccionados en este trabajo de titulación, fueron escogidos de acuerdo a lo que el laboratorio dispone y de tener la oportunidad de observar de cerca la metodología empleada por el INIAP, la cual se basa en lo propuesto por Díaz Romeu & Hunter (1978).
- 3) **Puesta a punto:** Es una actividad que se realiza antes de la validación de cada método analítico seleccionado. En la puesta a punto se obtuvo primeramente, un conocimiento general de cada método, para posteriormente ir afinando y ajustando distintas variables de los métodos y de este modo, conseguir que los mismos se



desempeñen adecuadamente; es decir proporcionen respuestas lo suficientemente aceptables y consistentes.

- 4) **Elección de los parámetros de validación:** En este punto fue importante disponer o tomar en cuenta algunas guías aplicables, bibliografía adecuada y la experiencia obtenida en la puesta a punto.
- 5) **Fijación de los objetivos:** La fijación de los objetivos se establecieron en base a los parámetros de validación seleccionados, considerando bibliografía aplicable y a partir de la experiencia obtenida en la puesta a punto de cada método.
- 6) **Diseño experimental y estadístico:** Se estableció un diseño experimental de la validación y el tratamiento estadístico que se va a aplicar a los datos experimentales que se obtengan, en el cual se establece:
  - Los tipos de muestras que van a ser ensayadas.
  - Se definen las submuestras a ser procesadas.
  - El procesamiento de las submuestras de manera simultánea en condiciones de repetibilidad y reproductibilidad, realizando el método analítico junto con el blanco.
  - Lectura instrumental, en el caso de estudio, se realizan lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis, tanto de las submuestras como del blanco.
  - Interpolación, empleando la curva de calibración para cada método y cálculos.

A continuación se presenta un esquema del diseño experimental.

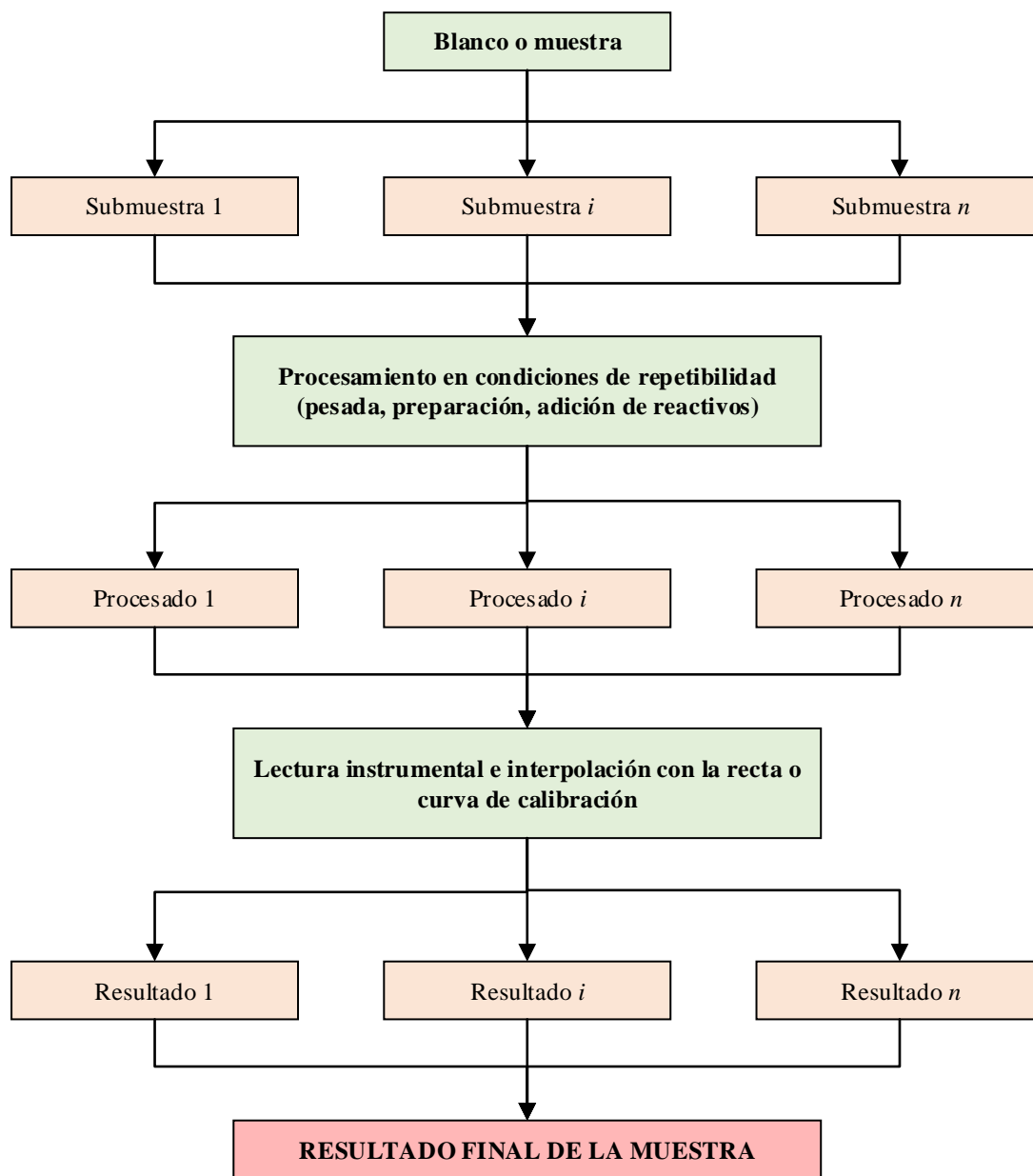


Figura 9. Esquema de diseño experimental

Fuente: Elaboración Propia

- 7) **Realización de los ensayos diseñados:** En base al procedimiento borrador disponible.
- 8) **Tratamiento estadístico de los datos obtenidos:** Se obtienen valores propios del laboratorio, para los parámetros de validación. En este punto fue necesario preguntarse de manera secuencial lo siguiente:



**a) ¿Los objetivos de la validación se cumplen?**

- En el caso de que se sí cumplan los mismos, se declara el método como validado y posteriormente a ello, se guardan los registros de forma ordenada, se aprueba el procedimiento y se difunde.
- En el caso de que, no se cumplan los objetivos planteados en la validación, deben analizarse las posibles causas y los incumplimientos.

**b) ¿Se han hallado las posibles causas o razones?**

- Si las causas fueron halladas, se debe realizar la respectiva corrección y se debe volver al diseño experimental, realizando otra vez los ensayos.
- En el caso de que, no se hallen las causas, se plantea la siguiente interrogante:

**c) ¿Se pueden cambiar los objetivos de la validación?**

- Si la respuesta es afirmativa, se deberá cambiar y fijar nuevamente los objetivos de la validación.
- Pero si no es posible cambiar los objetivos de la validación, es necesario regresar a la puesta a punto del método.

**9) Declaración del método validado y registro:** En este punto se guardan todos los registros de manera ordenada, se aprueba el procedimiento y se difunde o distribuye.

Es importante mencionar que *“Un procedimiento se considera validado, mientras no se produzcan cambios que impidan asegurar que se mantiene bajo control”*.



## 2.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE OLSEN MODIFICADO PARA DETERMINAR FÓSFORO DISPONIBLE EN SUELO POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS

### 2.5.1 OBJETO

El objeto del presente procedimiento es definir de forma sistemática la forma de realizar un ensayo de determinación de fósforo disponible por espectrofotometría UV-Vis.

### 2.5.2 ALCANCE

Este procedimiento de análisis cuantifica el fósforo disponible en el suelo utilizado por las plantas.

### 2.5.3 REFERENCIAS

- Díaz Romeu, R., & Hunter, A. (1978). *Metodología de muestreo de suelos, análisis químico de suelos y tejido vegetal e investigación en invernadero*. Costa Rica: Bib. Orton IICA / CATIE.
- McKean, S. J. (1993). *Manual de análisis de suelos y tejido vegetal. Una guía teórica y práctica de metodologías*.

### 2.5.4 PRINCIPIO O FUNDAMENTO TÉCNICO DEL ENSAYO

La muestra de suelo se extrae con solución extractante de bicarbonato de sodio a pH 8,5 (Chicaiza Hidalgo, 2001), misma que es adecuada para suelos calcáreos, alcalinos o neutros, los cuales poseen en su mayoría fosfatos de calcio en solución. Entonces, al adicionarse la solución extractante, los iones bicarbonato causan la precipitación del calcio como carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), disminuyendo por lo tanto la concentración del calcio en la solución y como resultado de esto, la concentración de fósforo aumenta (Díaz Romeu & Hunter, 1978). En el caso de los suelos ácidos, la solución extractante va a disolver parte de los fosfatos de hierro y aluminio presentes en el suelo, precipitando estos iones como hidróxidos, disminuyendo por ende la solubilidad del hierro y aluminio y aumentando la concentración de fosfato (Jackson, 1964; Khouri, 2005).





El EDTA presente en la solución extractante permitirá la formación de complejos en la determinación del fósforo disponible (Molina & Bornemisza, 2001; Salvatierra Bravo, 2002).

En el extracto de suelo resultante se determina el fósforo por espectrofotometría UV-Vis, método que se basa en la medición de la intensidad del color producido por el complejo de fosfomolibdato, mismo que es considerado como un heteropoliácido, el cual se forma por la reacción del ión ortofosfato con el ión molibdato en un sistema sulfúrico (Chicaiza Hidalgo, 2001), catalizado por el tartrato de antimonio y potasio. Este complejo formado, es reducido parcialmente por el ácido ascórbico, generándose así el color azul, permitiendo de este modo la determinación del fósforo disponible mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 680 nm (Jackson, 1964; Roda Vaca, Ruiz Alderete, & Viera, 2011).

## **2.5.5 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS**

### **2.5.5.1 EQUIPOS**

En la Tabla 6, se detallan los equipos empleados para determinación de fósforo disponible en el extracto suelo.

*Tabla 6. Equipos necesarios para la determinación de fósforo en suelo*

<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>MARCA</b>
Balanza analítica	Mettler Toledo
Agitador magnético	Corning
Espectrofotómetro UV- Vis	Thermo Scientific

***Fuente:*** *Elaboración Propia*

**2.5.5.2 MATERIALES**

La Tabla 7, muestra los materiales empleados para la determinación de fósforo en un extracto de suelo.

*Tabla 7. Materiales empleados para la determinación de fósforo en un extracto de suelo*

DESCRIPCIÓN	CAPACIDAD
Pipeta graduada	1 mL
Pipeta graduada	5 mL
Pipeta volumétrica	25 mL
Vaso de precipitación	100 mL
Varilla de vidrio	-----
Matraz aforado	1 L
Matraz aforado	100 mL
Erlenmeyer	50 mL
Embudo caña corta	Diámetro: 125 mm
Espátula	-----
Gradilla de tubos	-----
Tubos de ensayo	-----
Papel filtro Whatman No. 42	Diámetro: 125 mm
Recipiente medidor de suelo	2,5 mL

*Fuente: Elaboración Propia*

**2.5.5.3 REACTIVOS**

En la Tabla 8, se detallan los reactivos empleados para la determinación de fósforo en un extracto de suelo.

*Tabla 8. Reactivos empleados para la determinación de fósforo en un extracto de suelo*

DESCRIPCIÓN	FÓRMULA
Tartrato de potasio y antimonio	$C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$
Ácido sulfúrico concentrado	$H_2SO_4$
Molibdato de amonio	$(NH_4)_6 Mo_7 O_{24} \cdot 4H_2O$
Goma arábica	-----
Acido ascórbico	$C_6H_8O_6$
Fosfato de potasio monobásico	$KH_2PO_4$
Agua tipo I	$H_2O$

*Fuente: Elaboración Propia*



## 2.5.6 PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO

La preparación de los reactivos se basa en lo propuesto por Díaz Romeu & Hunter (1978):

### 2.5.6.1 SOLUCIÓN “A” REACTIVO CONCENTRADO

Para preparar un litro de la solución “A” se requiere:

- 1) Pesar 1 g de tartrato de potasio y antimonio y posteriormente, disolver en aproximadamente 400 mL de agua tipo I.
- 2) Agregar paulatinamente mientras se mezcla, 165 mL de ácido sulfúrico concentrado y dejar enfriar esta mezcla.
- 3) Pesar 7,5 g de molibdato de amonio y disolver en 300 mL de agua tipo I aproximadamente.
- 4) Una vez fría la solución de ácido y tartrato de potasio y antimonio, adicionar la solución de molibdato de amonio y aforar a un volumen de 1 litro con agua tipo I.

*NOTA: Debido a que la solución “A”, es sensible al calor y a la luz, debe ser guardada en frascos ámbar y en refrigeración, conservándose de este modo sin deterioro por al menos 2 meses.*

### 2.5.6.2 SOLUCIÓN “B” REACTIVO DE COLOR PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO

Para preparar 1 litro de la solución “B” se requiere:

- 1) Pesar 1 g de goma de arábica y disolver en aproximadamente 400 mL de agua tipo I caliente.
- 2) Pesar 1 g de ácido ascórbico y disolver en aproximadamente 300 mL de agua tipo I.
- 3) Mezclar las soluciones anteriores y adicionar 150 mL de solución “A” y llevar a un volumen de 1 litro con agua tipo I.

*NOTA: La solución “B” debe prepararse el día que se vaya a realizar la determinación de fósforo, ya que la misma se descompone después de 24 horas (Díaz Romeu & Hunter, 1978).*



### 2.5.6.3 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PATRÓN MADRE DE FÓSFORO Y DE LAS SOLUCIONES ESTÁNDAR PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN

#### 2.5.6.3.1 Solución patrón madre de fósforo

- 1) Pesar 4,3935 g de fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y disolver en agua tipo I y posteriormente, aforar hasta un volumen de 1 litro, en un matraz aforado de esa capacidad; esta solución contiene 1000  $\mu\text{g/ml}$  o 1000 ppm de fósforo.
- 2) A partir de la solución patrón madre de fósforo (1000 ppm), se preparará 100 mL de una solución patrón de 100 ppm; para ello se tomará 10 mL de la solución patrón madre y se aforará con agua tipo I hasta un volumen de 100 mL.

A partir de la solución patrón de 100 ppm, se preparará las soluciones estándar necesarias para la curva de calibración en el método.

#### 2.5.6.3.2 Soluciones estándar de fósforo

En la Tabla 9, se indica la forma de preparar 100 mL de las soluciones estándar para la curva de calibración, las cuales van desde 0 a 15 ppm de P.

Tabla 9. Preparación de soluciones estándar necesarias para obtener la curva de calibración de P

CURVA PATRÓN (ppm)	mL DEL PATRÓN DE 100 ppm P	mL DE SOLUCIÓN EXTRACTANTE OLSEN MODIFICADA pH 8,5
0	0	100
3	3	97
6	6	94
9	9	91
12	12	88
15	15	85

### 2.5.6.4 PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO

#### 2.5.6.4.1 Muestra de suelo

Al igual que lo anteriormente descrito, el procedimiento empleado se basa en lo propuesto por Díaz Romeu & Hunter (1978):



- 1) Colocar en 2,5 mL de suelo, 25 mL de la solución extractante Olsen modificado pH 8,5.
- 2) Agitar durante 10 minutos a velocidad lenta, aproximadamente (400 rpm).
- 3) Filtrar utilizando papel filtro Whatman No. 42 o su equivalente.
- 4) Colocar en un tubo de ensayo, 1 mL del filtrado (extracto de suelo), adicionar 4 mL de agua tipo I y 5 mL del reactivo de color (Solución “B”).
- 5) Homogenizar y dejar en reposo en la oscuridad durante 1 hora.
- 6) Leer en absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 680 nm.

#### **2.5.6.4.2 Soluciones estándar de fósforo (Preparación de la curva de calibración)**

La curva de calibración se prepara empleando como punto más alto de la misma el patrón de fósforo de 15 ppm y como blanco (0 ppm) la solución extractante Olsen modificado.

- 1) Colocar en un tubo de ensayo, 1 mL de la solución estándar de fósforo (0 – 3 – 6 – 9 – 12 y 15 ppm), adicionar 4 mL de agua tipo I y 5 mL del reactivo de color (Solución “B”).
- 2) Homogenizar y dejar en reposo en la oscuridad durante 1 hora.
- 3) Leer en absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 680 nm.

#### **2.5.6.5 MEDIDAS DE SEGURIDAD**

Debido a la naturaleza de los reactivos empleados para el análisis, se recomienda utilizar guantes, mandil y mascarilla.

#### **2.5.6.6 INFORME DE RESULTADOS, CÁLCULOS Y UNIDADES**

- Construir una curva de calibración utilizando las siguientes concentraciones: 0 – 3 – 6 – 9 – 12 y 15 ppm de P.
- Interpolar los datos de absorbancia de las muestras en la curva de calibración antes construida, considerar la relación 1:10 del método y reportar en mg de P por 1000 ml de suelo (ppm).



#### 2.5.6.6.1 Cálculos y unidades

$$P(\text{ppm}) = LR$$

Donde:

$LR$  = Concentración de la muestra analizada, este valor se obtiene de la interpolación en función de la absorbancia obtenida de la muestra dentro de la curva de regresión.

#### 2.5.6.7 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN O RECHAZO

Para el análisis, se correrán las soluciones estándar junto con las muestras a analizar. En el laboratorio se aceptará una curva de calibración con un  $r^2 \geq 0,99$ , valor que se establece en base al estudio realizado por Carrero A. et al. (2015).

#### 2.5.6.8 CONTROL DE CALIDAD

Se pueden realizar ensayos empleando una muestra de concentración conocida y en el caso de ser posible, participar en inter comparación con otros laboratorios.

### 2.5.7 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

#### 2.5.8 SELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN – FIJACIÓN DE LOS OBJETIVOS

A continuación en la Tabla 10, se presentan los parámetros de validación seleccionados para el método de determinación de fósforo disponible mediante el método de Olsen modificado (Parámetros de desempeño del método), de acuerdo a la experiencia adquirida en la puesta a punto del método y en base a las fuentes bibliográficas encontradas.

Tabla 10. Parámetros de validación para el método de fósforo disponible

PARÁMETRO	OBJETIVO ESTABLECIDO	REFERENCIA
Linealidad / Función respuesta	Ecuación lineal con un coeficiente de determinación $r^2 \geq 0,99$	(Carrero A. et al., 2015)
Límite de detección / límite de cuantificación	$\leq 3$ ppm	(Díaz Romeu & Hunter, 1978)
Precisión	$\leq 10$ % C.V.	(McKean, 1993; RELASE, 2016)
Exactitud	$\geq 90$ % de recuperación $\leq 110$ %	(OGA-GEC-016, 2007), puesta a punto
Intervalo de trabajo	3 a 15 ppm	(Díaz Romeu & Hunter, 1978)

Fuente: Elaboración Propia

### **2.5.9 DISEÑO EXPERIMENTAL**

A continuación, se detalla paso a paso el diseño experimental empleado en la validación del método de determinación de fósforo disponible mediante el método de Olsen modificado.

- **DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD (% RECUPERACIÓN)**

Debido a que no se dispone de un material de referencia, la muestra de suelo tomada de la Granja Integral Municipal de San Antonio, se envió a realizar su análisis en dos laboratorios: INIAP – Estación experimental del Austro e INIAP – Estación experimental Litoral Sur (Institución acreditada por el SAE). Los resultados proporcionados por ambos laboratorios fueron considerados como valores de referencia, para luego comparar nuestros resultados con los resultados de estos dos laboratorios.

- **DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN (REPETIBILIDAD Y REPRODUCTIBILIDAD)**

La muestra de suelo tomada de la Granja Integral Municipal de San Antonio, fue procesada 10 veces cada día en condiciones de repetibilidad y durante 5 días diferentes en condiciones de reproductibilidad, siguiendo el proceso de manera completa; dando un total de 50 muestras de suelo procesadas.

Con los resultados obtenidos del análisis de las 50 muestras de suelo, se calcula el coeficiente de variación porcentual de cada día (% C.V.) y su promedio.

Además con estos resultados, se realiza un análisis de varianza (ANOVA) planteando una hipótesis nula y una hipótesis alternativa.

- **OBTENCIÓN DE LA RESPUESTA INSTRUMENTAL O RECTA DE CALIBRADO**

Junto con las muestras de suelo analizadas, se preparó patrones trabajo (obtenidos a partir de una sustancias pura) para obtener una curva de calibración; para ello se emplearán seis niveles de concentración; es decir cinco patrones (3-6-9-12-15 ppm P)



más un blanco reactivo (0 ppm P), el cual es la solución extractante. Se realizará tres réplicas de cada patrón teniendo un total de:

- **Blancos:**  $= 1 * 3 = 3 \text{ blancos}$
- **Patrones:**  $= 5 * 3 = 15 \text{ patrones}$
- **Total**  $= (3 + 15) * (5 \text{ días}) = 90 \text{ unidades}$

Empleando los resultados obtenidos con los patrones de trabajo, se grafica (Absorbancia vs. Concentración) y se determina para cada día: el grado de ajuste; es decir el coeficiente de determinación de cada día ( $r^2$ ); también se determina el intercepto ( $a$ ) y la pendiente ( $b$ ). Estos datos posteriormente servirán para el cálculo de los intervalos de confianza de los coeficientes de regresión.

- **LÍMITE DE DETECCIÓN/ LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN**

Para calcular el límite de detección y límite de cuantificación, se preparó 10 blancos reactivos, siguiendo todo el proceso del método analítico y mediante cálculo, se estimaron los mismos. Posteriormente, se preparó 10 patrones de concentración conocida en base a lo calculado y se verificará si efectivamente se cuantifica.

- **RANGOS (BAJO, MEDIO Y ALTO)**

Se prepararon 10 patrones a tres niveles de concentración: bajo, medio y alto; es decir se preparó patrones de: 3, 9 y 15 ppm P. De los resultados obtenidos se determina el coeficiente de variación porcentual (% C.V.) y el porcentaje de recuperación (% R) de los mismos.





## 2.6 VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE OLSEN MODIFICADO PARA DETERMINAR NITRÓGENO AMONIAL EN SUELO POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS

### 2.6.1 PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

### 2.6.2 OBJETO

El objeto del presente procedimiento, es definir de forma sistemática la forma de realizar un ensayo de determinación de nitrógeno amoniacal por espectrofotometría UV-Vis.

### 2.6.3 ALCANCE

Este procedimiento de análisis cuantifica el nitrógeno amoniacal disponible en el suelo utilizado por las plantas.

### 2.6.4 REFERENCIAS

- Díaz Romeu, R., & Hunter, A. (1978). *Metodología de muestreo de suelos, análisis químico de suelos y tejido vegetal e investigación en invernadero*. Costa Rica: Bib. Orton IICA / CATIE.
- McKean, S. J. (1993). *Manual de análisis de suelos y tejido vegetal. Una guía teórica y práctica de metodologías*.

### 2.6.5 PRINCIPIO O FUNDAMENTO TÉCNICO DEL ENSAYO

El nitrógeno disponible (nitrógeno amoniacal) se extrae del suelo, empleando la solución extractante Olsen modificada a pH 8,5. La determinación de nitrógeno amoniacal ( $\text{N-NH}_4$ ) en el extracto de suelo, se basa en la formación de un complejo coloreado (azul indofenol), el cual se desarrolla por la reacción entre el amonio presente en el extracto de suelo y el fenol en solución alcalina (fenol básico), con la presencia de hipoclorito de sodio como agente oxidante. El color de este complejo coloreado tiene un color verde azulado, el cual se mide mediante espectrofotometría UV-Vis a una longitud de onda de 630 nm (McKean, 1993) y se compara con la intensidad de color que presentan soluciones estándar para poder estimar la concentración de las muestras de suelo.



## 2.6.6 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

### 2.6.6.1 EQUIPOS

En la Tabla 11, se detallan los equipos empleados para determinación de nitrógeno amoniacal en el extracto de suelo.

Tabla 11. Equipos necesarios para la determinación de nitrógeno amoniacal en el extracto de suelo

DESCRIPCIÓN	MARCA
Balanza analítica	Mettler Toledo
Agitador magnético	Corning
Espectrofotómetro UV- Vis	Thermo Scientific

*Fuente: Elaboración Propia*

### 2.6.6.2 MATERIALES

La Tabla 12, muestra los materiales empleados para la determinación de nitrógeno amoniacal en el extracto de suelo.

Tabla 12. Materiales empleados para la determinación de nitrógeno amoniacal en el extracto de suelo

DESCRIPCIÓN	CAPACIDAD
Pipeta graduada	1 mL
Pipeta graduada	5 mL
Pipeta volumétrica	25 mL
Vaso de precipitación	100 mL
Vaso de precipitación	1 L
Varilla de vidrio	-----
Matraz aforado	1 L
Matraz aforado	100 mL
Erlenmeyer	50 mL
Embudo caña corta	Diámetro: 125 mm
Espátula	-----
Gradilla de tubos	-----
Tubos de ensayo	-----
Papel filtro Whatman No. 42	Diámetro: 125 mm
Recipiente medidor de suelo	2,5 mL

*Fuente: Elaboración Propia*

### 2.6.6.3 REACTIVOS

En la Tabla 13, se detallan los reactivos empleados para la determinación de nitrógeno amoniacal en un extracto de suelo.



Tabla 13. Reactivos empleados para la determinación de nitrógeno amoniacal en un extracto de suelo

DESCRIPCIÓN	FÓRMULA
Fenol en cristales	$C_6H_5OH$
Hidróxido de sodio	$NaOH$
Hipoclorito de sodio comercial	$NaClO$
Cloruro de amonio	$NH_4Cl$
Agua tipo I	$H_2O$

*Fuente: Elaboración Propia*

## 2.6.7 PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO AMONICAL

La preparación de los reactivos se basa en lo propuesto por Díaz Romeu & Hunter (1978):

### 2.6.7.1 FENOL BÁSICO

Para preparar un litro de fenol básico se requiere:

- 1) Pesar 100 g de hidróxido de sodio y disolver en aproximadamente 500 mL de agua tipo I y dejar enfriar esta solución.
- 2) Una vez fría la solución de hidróxido de sodio, añadir 138 g de fenol en cristales y agitar hasta disolución completa. Posteriormente, llevar a un volumen de un litro empleando agua tipo I, para ello se empleará un matraz aforado de una capacidad de 1 L.

**NOTA:** Debido a que la solución de fenol básico es sensible al calor y a la luz, debe ser guardada en frascos ámbar y en refrigeración, conservándose de este modo sin deterioro aproximadamente 1 mes.

### 2.6.7.2 SOLUCIÓN DE HIPOCLORITO DE SODIO AL 5%

Para preparar 500 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 5%, partiendo de una solución de hipoclorito de sodio al 5,25 % de origen comercial se debe realizar lo siguiente:

- 1) Medir un volumen de 476,20 mL de hipoclorito de sodio comercial al 5,25 %.
- 2) Posteriormente, añadir 23,80 mL de agua tipo I y aforar en un balón de 500 mL de capacidad.



**NOTA:** Esta solución debe ser guardada en un frasco ámbar en la oscuridad, ya que es sensible a la luz (Proteger del sol) y a temperaturas entre 15 a 15 °C.

### 2.6.7.3 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PATRÓN MADRE DE NITRÓGENO Y DE LAS SOLUCIONES ESTÁNDAR PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN

#### 2.6.7.3.1 Solución patrón madre de nitrógeno

- 1) Pesar 3,8188 g de cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) y disolver en agua tipo I y posteriormente, aforar hasta un volumen de 1 litro, en un matraz aforado de esa capacidad; esta solución contiene 1000  $\mu\text{g/ml}$  o 1000 ppm de nitrógeno.
- 2) A partir de la solución patrón madre de nitrógeno (1000 ppm), se preparará 100 mL de una solución patrón de 100 ppm; para ello se tomará 10 mL de la solución patrón madre y se aforará con agua tipo I hasta un volumen de 100 mL.

A partir de la solución patrón de 100 ppm se preparará las soluciones estándar necesarias para la curva de calibración en el método.

#### 2.6.7.3.2 Soluciones estándar de nitrógeno

En la Tabla 14, se indica la forma de preparar 100 mL de las soluciones estándar para la curva de calibración, las cuales van desde 0 a 15 ppm de  $\text{N-NH}_4^+$ .

Tabla 14. Preparación de soluciones estándar necesarias para obtener la curva de calibración

CURVA PATRÓN (ppm)	mL DEL PATRÓN DE 100 ppm N	mL DE SOLUCIÓN EXTRACTANTE OLSEN MODIFICADA pH 8,5
0	0	100,0
2,5	2,5	97,5
5	5	95,0
7,5	7,5	92,5
10	10	90,0
15	15	85,0

*Fuente: Elaboración Propia*



#### **2.6.7.4 PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO AMONIAL**

##### **2.6.7.4.1 Muestra de suelo**

Al igual que lo anteriormente descrito, el procedimiento empleado se basa en lo propuesto por Díaz Romeu & Hunter (1978):

- 1) A 2,5 mL de suelo, adicionar 25 mL de la solución extractante Olsen modificado pH 8,5.
- 2) Agitar durante 10 minutos a velocidad lenta aproximadamente (400 rpm).
- 3) Filtrar utilizando papel filtro Whatman No. 42 o su equivalente.
- 4) Colocar en un tubo de ensayo, 1 mL del filtrado (extracto de suelo), adicionar 4 mL de fenol básico y 5 mL de la solución de hipoclorito de sodio al 5 %.
- 5) Homogenizar y dejar en reposo en la oscuridad durante 1 hora.
- 6) Leer en absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 630 nm.

##### **2.6.7.4.2 Soluciones estándar de nitrógeno (Preparación de la curva de calibración)**

La curva de calibración se prepara empleando como punto más alto de la misma al patrón de nitrógeno amoniacal de 15 ppm y como blanco (0 ppm) la solución extractante Olsen modificado.

- 1) Colocar en un tubo de ensayo, 1 mL de la solución estándar de nitrógeno (0 - 2,5 – 5 – 7,5 –10 y 15 ppm), adicionar 4 mL de fenol básico y 5 mL de la solución de hipoclorito de sodio al 5 %.
- 2) Homogenizar y dejar en reposo en la oscuridad durante 1 hora.
- 3) Leer en absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 630 nm.

##### **2.6.7.5 MEDIDAS DE SEGURIDAD**

Debido a la naturaleza de los reactivos empleados para el análisis, se recomienda utilizar guantes, mandil y mascarilla.



### 2.6.7.6 INFORME DE RESULTADOS, CÁLCULOS Y UNIDADES

- Construir una curva de calibración utilizando las siguientes concentraciones: 0 – 2,5– 5 – 7,5 – 10 y 15 ppm de  $N-NH_4^+$ .
- Interpolar los datos de absorbancia de las muestras en la curva de calibración antes construida, considerar la relación 1:10 del método y reportar en mg de  $N-NH_4^+$  por 1000 ml de suelo (ppm).

#### 2.6.7.6.1 Cálculos y unidades

$$N - NH_4^+ (ppm) = LR$$

Donde:

LR = Concentración de la muestra analizada, este valor se obtiene de la interpolación en función de la absorbancia obtenida de la muestra dentro de la curva de regresión.

#### 2.6.7.7 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN O RECHAZO

Para el análisis, se correrán las soluciones estándar junto con las muestras a analizar. En el laboratorio se aceptará una curva de calibración con un  $r^2 \geq 0,99$ . Este valor fue establecido en base al estudio realizado por Pulgarín (2005).

#### 2.6.7.8 CONTROL DE CALIDAD

Se pueden realizar ensayos empleando una muestra de concentración conocida y en el caso de ser posible, participar en inter comparación con otros laboratorios.

### 2.6.8 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

#### 2.6.9 SELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN – FIJACIÓN DE LOS OBJETIVOS

A continuación en la Tabla 15, se presentan los parámetros de validación seleccionados para el método de determinación de nitrógeno amoniacal mediante el método de Olsen modificado (Parámetros de desempeño del método), conforme a la experiencia adquirida en la puesta a punto del método y en base a las fuentes bibliográficas encontradas.



Tabla 15. Parámetros de validación para el método de nitrógeno amoniacal

PARÁMETRO	OBJETIVO ESTABLECIDO	REFERENCIA
Linealidad / Función respuesta	Ecuación lineal con un coeficiente de determinación $r^2 \geq 0,99$	(Pulgarín, 2005)
Límite de detección / límite de cuantificación	$\leq 2,5$ ppm	(Banegas Sanmartín, 2014; McKean, 1993)
Precisión	$\leq 30$ % C.V.	(Gordón Mendoza & Camargo Buitrago, 2015; Ochoa M. & Suárez V., 2003)
Exactitud	$\geq 85$ % de recuperación $\leq 110$ %	(OGA-GEC-016, 2007), puesta a punto
Intervalo de trabajo	2,5 a 15 ppm	(Banegas Sanmartín, 2014; McKean, 1993)

*Fuente: Elaboración Propia*

## 2.6.10 DISEÑO EXPERIMENTAL

A continuación, se detalla diseño experimental empleado en la validación del método de determinación de nitrógeno amoniacal mediante el método de Olsen modificado.

- **DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD (% RECUPERACIÓN)**

Para ello empleamos un material de referencia de concentración conocida proporcionado por el laboratorio INIAP – Estación experimental del Austro, siguiendo el proceso de manera completa.

- **DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN (REPETIBILIDAD Y REPRODUCTIBILIDAD)**

La muestra de suelo tomada de la Granja Integral Municipal de San Antonio, fue procesada 10 veces cada día en condiciones de repetibilidad y durante 5 días diferentes en condiciones de reproductibilidad, siguiendo el proceso de manera completa; dando un total de 50 muestras de suelo procesadas.

Con los resultados obtenidos del análisis de las 50 muestras de suelo, se calcula el coeficiente de variación porcentual de cada día (% C.V.) y su promedio. Además con estos resultados se realiza un análisis de varianza (ANOVA) planteando una hipótesis nula y una hipótesis alternativa.



- **OBTENCIÓN DE LA RESPUESTA INSTRUMENTAL O RECTA DE CALIBRADO**

Junto con las muestras de suelo analizadas, se prepararán patrones trabajo (obtenidos a partir de una sustancias pura) para obtener una curva de calibración; para ello se emplearán seis niveles de concentración; es decir cinco patrones (2,5-5-7,5-10-15 ppm  $\text{NH}_4$ ) más un blanco reactivo (0 ppm  $\text{NH}_4$ ), el cual es la solución extractante. Se realizará tres réplicas de cada patrón teniendo un total de:

- **Blancos:**  $= 1 * 3 = 3 \text{ blancos}$
- **Patrones:**  $= 5 * 3 = 15 \text{ patrones}$
- **Total**  $= (3 + 15) * (5 \text{ días}) = 90 \text{ unidades}$

Empleando los resultados obtenidos con los patrones de trabajo, se grafica (Absorbancia vs. Concentración) y se determina para cada día: el grado de ajuste; es decir el coeficiente de determinación de cada día ( $r^2$ ); también se determina el intercepto ( $a$ ) y la pendiente ( $b$ ). Estos datos, posteriormente servirán para cálculo los intervalos de confianza de los coeficientes de regresión.

- **LÍMITE DE DETECCIÓN/ LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN**

Para calcular el límite de detección y límite de cuantificación, se prepararán 10 blancos reactivos, siguiendo todo el proceso del método analítico y mediante cálculo se estimarán los mismos. Posteriormente, se prepararán 10 patrones de concentración conocida en base a lo calculado y se verificará si efectivamente se cuantifica lo calculado.

- **RANGOS (BAJO, MEDIO Y ALTO)**

Se prepararon 10 patrones a tres niveles de concentración: bajo, medio y alto; es decir se preparó patrones de: 2,5, 7,5 y 15 ppm  $\text{NH}_4$ . De los resultados obtenidos se determina el coeficiente de variación porcentual de cada día (% C.V.) y el porcentaje de recuperación (% R) de los mismos.





### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE OLSEN MODIFICADO PARA DETERMINAR FÓSFORO DISPONIBLE EN SUELO POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS

##### 3.1.1 PRECISIÓN (REPETIBILIDAD/REPRODUCTIBILIDAD)

El estudio de la precisión se calculó, empleando un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor (tiempo), mismo que se emplea debido a que se dispone de una serie de resultados en concentración (ppm), procedentes del análisis de la muestra de suelo agrupados en cinco días (niveles), con el fin de comprobar si existen diferencias de los resultados, dentro de un mismo día y en los diferentes días (Guía Eurachem, 2016). El análisis de la muestra se realizó en condiciones de repetibilidad y reproductibilidad. A continuación, se muestra esquemáticamente como se realiza el análisis de varianza de un solo factor.

En base a lo que plantea Murray R. (1991), la media de cada día es igual a:

$$L_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} L_{i,j}}{10} \quad (12)$$

Donde: "j" representa las columnas, mientras que "i" las filas.

Y la media general es igual a:

$$L = \frac{\sum_{i=1}^5 L_i}{5} \quad (13)$$

Tabla 16. Resultados del análisis de una muestra de suelo (Fósforo disponible)

No. MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ppm)					MEDIA <sub>R</sub>	DESVEST. <sub>R</sub>	% C.V. <sub>R</sub>
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5			
M1	39,52	39,75	42,47	38,25	39,32	39,86	1,57	3,93
M2	42,12	36,61	41,49	37,86	36,12	38,84	2,79	7,18
M3	38,72	38,76	40,12	38,84	39,12	39,11	0,58	1,49
M4	41,12	35,63	39,53	37,47	38,32	38,41	2,08	5,40
M5	38,92	39,75	37,96	37,27	41,92	39,16	1,80	4,61
M6	37,72	38,57	35,02	40,22	42,92	38,89	2,93	7,55
M7	40,12	39,35	39,92	38,65	42,32	40,07	1,38	3,45
M8	35,12	40,73	40,31	38,06	41,72	39,19	2,64	6,74
M9	40,32	38,96	35,41	38,84	38,72	38,45	1,82	4,73
M10	39,92	41,71	38,16	39,82	35,12	38,95	2,48	6,37
MEDIA <sub>r</sub> (L <sub>i</sub> )	39,36	38,98	39,04	38,53	39,56		MEDIA %C.V. <sub>R</sub>	5,1
MEDIA GENERAL <sub>r</sub> (L)	39,09							
DESVEST. <sub>r</sub>	1,94	1,79	2,42	0,95	2,65			
%C.V. <sub>r</sub>	4,93	4,59	6,21	2,47	6,70			
MEDIA %C.V. <sub>r</sub>	5,0							

Fuente: Elaboración Propia

**Análisis:** Como se observa en la Tabla 16, la media del coeficiente de variación porcentual considerando las condiciones de repetibilidad (MEDIA %C.V.<sub>r</sub>) es menor al 10 %, según lo planteado en el estudio; al igual que la media del coeficiente de variación porcentual, considerando las condiciones de reproductibilidad (MEDIA %C.V.<sub>R</sub>). Por lo tanto, se considera que los resultados en las condiciones planteadas son homogéneos; puesto que, el % C.V. mide la dispersión de los resultados con relación a la media.



La estructura de una tabla ANOVA de un factor, según la Guía Eurachem (2016) se muestra a continuación:

Tabla 17. Estructura de una tabla ANOVA de un factor

Fuente de variación	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad ( $\nu$ )	Promedio de los cuadrados (MS)	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	$SS_e$	$p - 1$	$MS_e = \frac{SS_e}{p - 1}$	$\frac{MS_e}{MS_i}$	-----	-----
Dentro de los grupos o intra grupo	$SS_i$	$N - p$	$MS_i = \frac{SS_i}{N - p}$			
<b>Total</b>	$SS_{tot}$	$N - 1$				

**Fuente:** (Guía Eurachem, 2016)

Donde:

$p$  = Grupos de división (5 días).

$N$  = Número total de observaciones o datos (50 datos).

La suma de cuadrados entre los grupos es igual a:

$$SS_e = \sum_{i=1}^{10} 10(L_i - L)^2 \quad (14)$$

La suma de cuadrados dentro de los grupos es igual a:

$$SS_i = \sum_{i=1}^5 \sum_{j=1}^{10} (L_{i,j} - L)^2 \quad (15)$$

A continuación en la siguiente tabla se muestran los resultados del análisis ANOVA de un factor, aplicado a los 50 ensayos de análisis de la muestra de suelo, realizados en 5 días en condiciones de repetibilidad y reproductibilidad, considerando para el análisis un nivel de confianza del 95 % ( $\alpha = 0,05$  o 5%).

Previo a realizar el análisis ANOVA de un solo factor se plantearon las siguientes hipótesis:

- **HIPÓTESIS NULA ( $H_0$ ):** Todas las medias son iguales. Considerándose como niveles los 5 días y como factor el tiempo.
- **HIPÓTESIS ALTERNATIVA ( $H_1$ ):** Al menos una media es diferente.

Tabla 18. Resultado ANOVA de un factor

Fuente de variación	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad ( $\nu$ )	Promedio de los cuadrados (MS)	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	6,23	4	1,56	0,37	0,83	2,58
Dentro de los grupos o intra grupo	186,89	45	4,15			
<b>Total</b>	193,11	49				

Fuente: Elaboración Propia

Conforme a los resultados obtenidos de la Tabla 18, se puede observar que el valor de “F” (estadístico que indica el grado de similitud que existe entre las medias que se comparan), es menor al “Valor crítico para F” (Obtenido de una Tabla F, la cual está en función del grado de significancia  $\alpha = 0,05$ , considerando los grados de libertad entre grupos y dentro de los grupos). Entonces, si:

$F < \text{Valor crítico de } F$ , se considera que no existen diferencias significativas entre los diferentes grupos muestrales (diferentes días); es decir los resultados de la concentración de fósforo disponible de una muestra suelo realizada en diferentes días no difieren significativamente. Por lo tanto: **Se acepta la HIPÓTESIS NULA ( $H_0$ ).**

### 3.1.2 EXACTITUD

La exactitud del método analítico, permite observar el grado de concordancia existente entre el valor obtenido con respecto al valor esperado, considerado como referencia. En el estudio, se establecerá una comparación entre el promedio de los resultados obtenidos, analizando la muestra de suelo en el diseño experimental; con los resultados proporcionados por el INIAP- Estación Experimental del Austro, institución que posee estos métodos validados y con los resultados proporcionados por el INIAP - Estación Experimental del Litoral Sur, institución acreditada por el Servicio de Acreditación Ecuatoriano (SAE). Los resultados procedentes de los laboratorios se encuentran en el Anexo 2 y 3. La exactitud se expresará como porcentaje de recuperación  $R$  (%), empleando la ecuación (8):

$$R (\%) = \frac{\bar{x}}{x_{ref}} \cdot 100$$

Donde:

$\bar{x}$  = Promedio del conjunto de resultados obtenidos (Valor obtenido).

$x_{ref}$  = Valor de referencia aceptado (Valor esperado).

Tabla 19. Porcentaje de recuperación  $R$  (%) (Análisis del fósforo disponible en suelo)

DESCRIPCIÓN		FÓSFORO DISPONIBLE (ppm)	R (%)
Laboratorio de suelos – Facultad de Ciencias Químicas	$\bar{x}$	39,09	-----
INIAP - Estación Experimental del Austro	$x_{ref1}$	42,72	<b>92</b>
<b>INIAP - Estación Experimental del Litoral Sur</b> <i>(Institución Acreditada por el SAE)</i>	$x_{ref2}$	39,00	<b>100</b>
<b>R (%) PROMEDIO</b>			<b>96</b>

*Fuente: Elaboración Propia*

**Análisis:** Como se observa en la Tabla 19, se obtuvo un porcentaje de recuperación mayor al comparar el valor de referencia proporcionado por el INIAP - Estación Experimental del Litoral Sur, en comparación con el resultado proporcionado por INIAP - Estación



Experimental del Austro; sin embargo en ambos casos se obtiene un porcentaje de recuperación dentro de los objetivos de validación establecidos según la Tabla 10 ( $\geq 90\%$  de recuperación  $\leq 110\%$ ).

### 3.1.3 LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD)

El límite de detección, se obtuvo realizando 10 mediciones del blanco sometidos a todo el procedimiento concerniente a la determinación de fósforo disponible, en este caso se empleó la solución extractante Olsen modificada pH 8,5 como blanco de reactivo (Guía Eurachem, 2016). A continuación, en la Tabla 20 se muestran los resultados, las ecuaciones (2) y (4), fueron empleadas para el cálculo del límite de detección.

Tabla 20. Límite de detección (LOD) fósforo

BLANCO	ABSORBANCIA (A)
B1	0,024
B2	0,018
B3	0,018
B4	0,019
B5	0,021
B6	0,022
B7	0,024
B8	0,017
B9	0,022
B10	0,025
$\bar{S}_{bl}$	<b>0,021</b>
$s_{bl}$	<b>0,003</b>
$S_{m,LOD} = \bar{S}_{bl} + 3 \cdot s_{bl}$ * Límite de detección como señal analítica (A)	<b>0,03</b>
$C_{m,LOD} = \frac{S_{m,LOD} - \bar{S}_{bl}}{m}$ * Límite de detección como concentración (ppm) $m = 0,0505$	<b>0,17</b>

Fuente: Elaboración Propia

### 3.1.4 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ)

El límite de cuantificación, se calcula empleando las ecuaciones (3) y (5), para ello también se requieren los resultados de las 10 mediciones de blanco reactivo, sometidos a todo el procedimiento concerniente a la determinación de fósforo disponible, presentados en la Tabla 20.

Dentro de los parámetros de validación, se sugirió que el límite de cuantificación para el método del fósforo disponible sea  $\leq 3$  ppm, en base a fuentes de consulta como Banegas Sanmartín (2014) y Díaz Romeu & Hunter (1978). El valor del límite de cuantificación calculado mediante fórmula fue de 0,57 ppm. Este valor calculado, se considera un valor referencial, por lo que se decidió verificar si el equipo cuantifica un valor más bajo, planteando una concentración de 0,5 ppm. Posteriormente, se preparó 10 patrones de 0,5 ppm, cuantificándose los mismos satisfactoriamente. A continuación, en la Tabla 21 y Tabla 22, se muestran los resultados.

Tabla 21. Límite de cuantificación calculado (LOQ) fósforo

<b>LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN CALCULADO</b>	
$\bar{S}_{bl}$	<b>0,021</b>
$s_{bl}$	<b>0,003</b>
$S_{m,LOQ} = \bar{S}_{bl} + 10 \cdot s_{bl}$ * Límite de cuantificación como señal analítica (A)	<b>0,05</b>
$C_{m,LOQ} = \frac{S_{m,LOQ} - \bar{S}_{bl}}{m}$ * Límite de cuantificación como concentración (ppm) <b><math>m = 0,0505</math></b>	<b>0,57</b>

*Fuente: Elaboración Propia*

Tabla 22. Verificación del límite de cuantificación (LOQ) fósforo

PATRÓN	VERIFICACIÓN
	0,5 ppm
P1	0,50
P2	0,46
P3	0,52
P4	0,56
P5	0,54
P6	0,50
P7	0,48
P8	0,52
P9	0,46
P10	0,48
<b>PROMEDIO</b>	<b>0,50</b>
<b>DESVIACIÓN EST.</b>	<b>0,03</b>
<b>COEF.VARIABILIDAD C.V</b>	<b>0,065</b>
<b>COEF.VARIABILIDAD C.V %</b>	<b>6,55</b>
<b>R (%)</b>	<b>100,59</b>

*Fuente: Elaboración Propia*

**Análisis (LOD/LOQ):** En base a los resultados obtenidos en la Tabla 22, se observa que es posible cuantificar fósforo desde una concentración de 0,5 ppm.

### 3.1.5 SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD

El método de Olsen modificado para determinar fósforo disponible en suelo por espectrofotometría UV-Vis, es específico y selectivo, pues es un método de reconocida aplicación con respecto a esta determinación; el cual es empleado por los laboratorios del INIAP y AGROCALIDAD, instituciones reconocidas a nivel nacional (RELASE, 2016). En este estudio no se consideró este parámetro, pues en el proceso de validación se partió conociendo que el método se encontraba validado por el INIAP – Estación experimental del Austro, más no se validó un método nuevo desarrollado por el laboratorio.





### 3.1.6 FUNCIÓN DE RESPUESTA

#### 3.1.6.1 INTERVALO DE TRABAJO VALIDADO

El intervalo de trabajo validado en este caso, puede disminuir como resultado de la validación. Sin embargo, en este trabajo de titulación, se partió con un intervalo de trabajo de 3 a 15 ppm, según lo consultado en fuentes como Banegas Sanmartín (2014) y McKean, (1993). Los datos obtenidos del proceso de validación tienen una función respuesta o rectas de calibrado lineales y un coeficiente de determinación de  $r^2 \geq 0,99$ .

#### 3.1.6.2 FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL / LINEALIDAD

La función de respuesta instrumental del sistema de lectura, se conoce también como recta de calibración. Esta función de respuesta se obtuvo cada día con los 18 pares de valores formados por las 3 réplicas, tanto del blanco como de los 5 patrones de trabajo, mismos que cubrían el intervalo de trabajo del método analítico. Debido a que los datos se ajustaron a una recta, es decir la respuesta fue lineal, por lo tanto la ecuación (1) representa a esta función y al ser de este tipo, hablamos de “Regresión lineal”, siendo:  $y$  es la Absorbancia (variable aleatoria dependiente),  $a$  el intercepto,  $b$  la pendiente y  $x$  es la concentración (variable aleatoria independiente de la que conocemos el valor). Los parámetros  $a$  y  $b$ , se estiman por el método de mínimos cuadrados.

$$y = bx \pm a$$

El coeficiente de determinación  $r^2$ , debe encontrarse dentro de lo de valor prefijado ( $r^2 \geq 0,99$ ) para considerarse que la función es lineal dentro del intervalo de concentraciones de estudio. Además, se debe calcular el error tipo en la estimación (con la recta de regresión) de  $y$  a partir de los valores de  $x$  (Mulki Piñeyros, s/f):

$$S_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-2}} \quad (16)$$



El cuadrado del error tipo en la estimación  $S_{y,x}^2$ , se conoce como: “*Varianza residual*” y mide la dispersión en torno a la recta de regresión; es decir, es la varianza de  $y$  una vez suprimida la influencia de la dispersión de  $x$  (Mulki Piñeyros, s/f).

Donde:

$y_i$  = Absorbancia promedio observada.

$\bar{y}$  = Absorbancia estimada con la recta de regresión.

$n$  = Número de pares de valores.

La desviación estándar de los coeficientes se calculan de la siguiente forma:

$$S_b = \frac{S_{y,x}}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (17)$$

$$S_a = S_b \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n}} \quad (18)$$

Donde:

$x_i$  = Valores asignados a los patrones.

$\bar{x}$  = Concentración promedio de todos los patrones, incluido el blanco.

Los intervalos de confianza de los parámetros  $a$  y  $b$  son:

$$b \pm t \cdot S_b$$

$$a \pm t \cdot S_a$$

Donde:

$t$  = Es la  $t$  de Student para  $n-2$  grados de libertad y el nivel de significancia correspondiente.

A continuación en la siguiente tabla, se muestran los resultados:

Tabla 23. Resultados función respuesta

FUNCIÓN RESPUESTA	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	PROMEDIO
<b>PENDIENTE (b)</b>	0,0505	0,0506	0,0506	0,0506	0,0506	<b>0,0506</b>
<b>ERROR DE b (Sb)</b>	0,00013	0,00017	0,00014	0,00018	0,00014	<b>0,00015</b>
<b>INTERCEPTO (a)</b>	0,0002	0,0002	0,0003	-0,0002	-0,00002	<b>0,0001</b>
<b>ERROR DE a (Sa)</b>	0,0011	0,0016	0,0012	0,0016	0,0013	<b>0,0014</b>
<b>COEFICIENTE DE DET. (r<sup>2</sup>)</b>	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	<b>0,9999</b>

Fuente: Elaboración Propia



Los intervalos de confianza, a un nivel de confianza del 95 % de los parámetros  $a$  y  $b$  son:

$$b \pm t \cdot S_b \rightarrow 0,0506 \pm 0,0003$$

$$a \pm t \cdot S_a \rightarrow 0,0001 \pm 0,0029$$

### 3.1.6.3 RANGOS (BAJO, MEDIO Y ALTO)

Se prepararon 10 patrones de: 3, 9 y 15 ppm P. De los resultados obtenidos se determinó el coeficiente de variación porcentual (% C.V.) y el porcentaje de recuperación (% R). A continuación en la siguiente tabla se detallan los resultados.

Tabla 24. Resultados rangos (Bajo, medio y alto) fósforo

	RANGO BAJO	RANGO MEDIO	RANGO ALTO
PATRÓN	3 ppm	9 ppm	15 ppm
P1	3,09	9,31	15,07
P2	3,06	9,06	14,76
P3	3,13	8,96	15,09
P4	2,92	9,06	15,60
P5	2,96	9,11	15,13
P6	3,02	8,94	15,21
P7	3,21	8,98	14,89
P8	3,08	9,11	15,52
P9	2,92	8,68	15,01
P10	3,06	8,94	15,56
PROMEDIO [X]	3,04	9,01	15,19
DESVIACIÓN EST. [S]	0,09	0,16	0,29
COEF.VARIABILIDAD C.V	0,03	0,02	0,02
COEF.VARIABILIDAD C.V %	3,04	1,81	1,91
% (R)	101,47	100,15	101,24

Fuente: Elaboración Propia

**Análisis (RANGOS):** Con respecto a los resultados obtenidos, se observa que el coeficiente de variación porcentual es inferior al 10 %, lo cual se considera aceptable, en cuanto al porcentaje de recuperación se observa que se encuentra dentro de los valores fijados ( $\geq 90$  % de recuperación  $\leq 110$  %).



### **3.2 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE OLSEN MODIFICADO PARA DETERMINAR NITRÓGENO AMONIAICAL EN SUELO POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS**

#### **3.2.1 PRECISIÓN (REPETIBILIDAD/REPRODUCTIBILIDAD)**

El estudio de la precisión se realizó empleando un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor (tiempo), al igual que en el caso del proceso de validación de fósforo disponible, mismo que se emplea debido a que, se dispone de una serie de resultados en concentración (ppm) procedentes del análisis de la muestra de suelo agrupados en cinco días (niveles), con el fin de comprobar si existen diferencias de los resultados dentro de un mismo día y en los diferentes días (Guía Eurachem, 2016). El análisis de la muestra se realizó en condiciones de repetibilidad y reproductibilidad.

De acuerdo a lo planteado por Murray R. (1991), la media de cada día se calculó de acuerdo a la ecuación (12) y la media general se calculó a partir de la ecuación (13) antes mencionada.

Tabla 25. Resultados del análisis de una muestra de suelo (Nitrógeno Amoniacal)

No. MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ppm)					MEDIA <sub>R</sub>	DESVEST. <sub>R</sub>	% C.V. <sub>R</sub>
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5			
M1	17,17	11,31	13,54	17,17	21,71	16,18	3,98	24,59
M2	13,00	22,85	22,77	13,00	22,43	18,81	5,31	28,20
M3	22,17	17,46	14,31	22,17	19,57	19,13	3,34	17,47
M4	27,17	20,54	19,69	18,83	14,57	20,16	4,54	22,52
M5	23,83	10,54	13,54	13,83	16,00	15,55	5,02	32,31
M6	25,50	25,92	25,85	12,17	14,57	20,80	6,84	32,88
M7	18,00	19,00	15,85	19,67	18,14	18,13	1,44	7,97
M8	25,50	14,38	21,23	22,17	12,43	19,14	5,51	28,81
M9	16,33	20,54	12,00	15,50	13,14	15,50	3,31	21,37
M10	14,67	25,15	20,46	16,33	26,00	20,52	5,08	24,76
MEDIA <sub>r</sub> (L <sub>i</sub> )	20,33	18,77	17,92	17,08	17,86		MEDIA %C.V. <sub>R</sub>	24,09
MEDIA GENERAL <sub>r</sub> (L)	18,39							
DESVEST. <sub>r</sub>	5,09	5,37	4,69	3,59	4,49			
%C.V. <sub>r</sub>	25,03	28,59	26,15	21,01	25,17			
MEDIA %C.V. <sub>r</sub>	25,19							

Fuente: Elaboración Propia

**Análisis:** Como se observa en la Tabla 25, la media del coeficiente de variación porcentual considerando las condiciones de repetibilidad (MEDIA %C.V.<sub>r</sub>) es menor al 30 %, según lo planteado en el estudio; al igual que la media del coeficiente de variación porcentual, considerando las condiciones de reproductibilidad (MEDIA %C.V.<sub>R</sub>).



A continuación en la siguiente tabla se muestran los resultados del análisis ANOVA de un factor, aplicado a los 50 ensayos de análisis de la muestra de suelo, realizados en 5 días en condiciones de repetibilidad y reproductibilidad, considerando para el análisis un nivel de confianza del 95 % ( $\alpha = 0,05$  o 5%).

Previo a realizar el análisis ANOVA de un solo factor se plantearon las siguientes hipótesis:

- **HIPÓTESIS NULA ( $H_0$ ):** Todas las medias son iguales. Considerándose como niveles los 5 días y como factor el tiempo.
- **HIPÓTESIS ALTERNATIVA ( $H_1$ ):** Al menos una media es diferente.

Tabla 26. Resultado ANOVA de un factor

Fuente de variación	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad ( $\nu$ )	Promedio de los cuadrados (MS)	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	61,30	4	15,32	0,70	0,60	2,58
Dentro de los grupos o intra grupo	987,72	45	21,95			
<b>Total</b>	<b>1049,01</b>	<b>49</b>				

Fuente: Elaboración Propia

Con respecto a los resultados obtenidos de la Tabla 26, se puede observar que el valor de “F”, es menor al “Valor crítico para F”. Entonces, si:

$F < \text{Valor crítico de } F$ , se considera que no existen diferencias significativas entre los diferentes grupos muestrales (diferentes días); es decir los resultados de la concentración de nitrógeno amoniacal de una muestra suelo realizada en diferentes días no difieren significativamente. Por lo tanto: **Se acepta la HIPÓTESIS NULA ( $H_0$ )**.

### 3.2.2 EXACTITUD

En el estudio, se empleó una muestra patrón de referencia de concentración conocida. La exactitud se expresará como porcentaje de recuperación R (%), empleando la ecuación (8):

Tabla 27. Porcentaje de recuperación R (%), análisis de nitrógeno amoniacal en suelo

DESCRIPCIÓN		NITRÓGENO AMONICAL (ppm)	R (%)
Laboratorio de suelos – Facultad de Ciencias Químicas	$\bar{x}$	93,25	-----
INIAP - Estación Experimental del Austro	$x_{ref}$	105	<b>89</b>

*Fuente: Elaboración Propia*

**Análisis:** Como se observa en la Tabla 27, se obtuvo un porcentaje de recuperación dentro de los valores fijados ( $\geq 85$  % de recuperación  $\leq 110$  %).

### 3.2.3 LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD)

El límite de detección, se obtuvo realizando 10 mediciones del blanco sometidos a todo el procedimiento referente a la determinación de nitrógeno amoniacal, empleando la solución extractante Olsen modificada pH 8,5 como blanco de reactivo. En la Tabla 28, se muestran los resultados.

Tabla 28. Límite de detección (LOD) nitrógeno amoniacal

BLANCO	ABSORBANCIA (A)
B1	0,010
B2	0,011
B3	0,013
B4	0,008
B5	0,008
B6	0,010
B7	0,009
B8	0,009
B9	0,010
B10	0,007
$\bar{s}_{bl}$	<b>0,010</b>
$s_{bl}$	<b>0,002</b>

*Fuente: Elaboración Propia*

Tabla 28. Continuación

$S_{m,LOD} = \bar{S}_{bl} + 3 \cdot s_{bl}$ <p>* Límite de detección como señal analítica (A)</p>	0,015
$C_{m,LOD} = \frac{S_{m,LOD} - \bar{S}_{bl}}{m}$ <p>* Límite de detección como concentración (ppm)</p> <p><math>m = 0,0130</math></p>	0,40

Fuente: Elaboración Propia

### 3.2.4 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ)

El límite de cuantificación, se calcula empleando las ecuaciones (3) y (5); para ello también se requieren los resultados de las 10 mediciones de blanco reactivo, sometidos a todo el procedimiento concerniente a la determinación de nitrógeno amoniacal, indicados en la Tabla 28.

Dentro de los parámetros de validación, se propuso que el límite de cuantificación para este método sea  $\leq 2,5$  ppm, en base a fuentes de consulta como Banegas Sanmartín (2014) y McKean (1993). El valor del límite de cuantificación calculado, mediante fórmula fue de 1,32 ppm. Sin embargo, este valor calculado se considera referencial, por lo que se decidió verificar si el equipo cuantifica un valor más bajo, planteando entonces una concentración de 1 ppm. Posteriormente, se preparó 10 patrones de 1 ppm, cuantificándose los mismos exitosamente. A continuación, en la Tabla 29 y Tabla 30, se muestran los resultados.

Tabla 29. Límite de cuantificación calculado (LOQ) nitrógeno amoniacal

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN CALCULADO	
$\bar{S}_{bl}$	0,010
$s_{bl}$	0,002
$S_{m,LOQ} = \bar{S}_{bl} + 10 \cdot s_{bl}$ <p>* Límite de cuantificación como señal analítica (A)</p>	0,027
$C_{m,LOQ} = \frac{S_{m,LOQ} - \bar{S}_{bl}}{m}$ <p>* Límite de cuantificación como concentración (ppm)</p> <p><math>m = 0,0130</math></p>	1,32

Fuente: Elaboración Propia



*Tabla 30. Verificación del límite de cuantificación (LOQ) nitrógeno amoniacal*

<b>PATRÓN</b>	<b>VERIFICACIÓN</b>
	<b>1 ppm</b>
P1	0,98
P2	1,12
P3	1,05
P4	1,05
P5	0,98
P6	1,05
P7	1,05
P8	0,91
P9	1,20
P10	1,05
<b>PROMEDIO</b>	<b>1,04</b>
<b>DESVIACIÓN EST.</b>	<b>0,08</b>
<b>COEF.VARIABILIDAD C.V</b>	<b>0,076</b>
<b>COEF.VARIABILIDAD C.V %</b>	<b>7,64</b>
<b>R (%)</b>	<b>104,35</b>

*Fuente: Elaboración Propia*

**Análisis (LOD/LOQ):** Con respecto a los resultados obtenidos, se observa que es posible cuantificar nitrógeno amoniacal desde una concentración de 1 ppm.

### **3.2.5 SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD**

El método de Olsen modificado para determinar nitrógeno amoniacal en suelo por espectrofotometría UV-Vis, es específico y selectivo, pues es un método de reconocida aplicación con respecto a esta determinación; el cual es empleado por los laboratorios del INIAP, institución reconocida a nivel nacional (RELASE, 2016). En este estudio no se consideró este parámetro, pues en el proceso de validación se partió conociendo que el método se encontraba validado por el INIAP – Estación experimental del Austro, más no se validó un método nuevo desarrollado por el laboratorio.

### 3.2.6 FUNCIÓN DE RESPUESTA

#### 3.2.6.1 INTERVALO DE TRABAJO VALIDADO

El intervalo de trabajo validado en este caso, puede disminuir producto de la validación. No obstante, en este trabajo de titulación se estableció un intervalo de trabajo de 2,5 a 15 ppm, según lo consultado en fuentes como Banegas Sanmartín (2014) y McKean, (1993). Los datos obtenidos del proceso de validación tienen una función respuesta o rectas de calibrado lineales y un coeficiente de determinación  $r^2 \geq 0,99$ .

#### 3.2.6.2 FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL / LINEALIDAD

La función de respuesta instrumental del sistema de lectura o conocida como recta de calibración. Esta función de respuesta se obtuvo cada día con los 18 pares de valores formados por las 3 réplicas tanto del blanco como de los 5 patrones de trabajo, mismos que cubrían el intervalo de trabajo del método analítico. Debido a que los datos se ajustaron a una recta, es decir la respuesta fue lineal, se empleará la ecuación (1) para representar la función.

El coeficiente de determinación  $r^2$ , debe encontrarse dentro de lo de valor prefijado ( $r^2 \geq 0,99$ ) para considerarse que la función es lineal dentro del intervalo de concentraciones de estudio.

Además, se debe calcular el error tipo en la estimación (con la recta de regresión) de  $y$  a partir de los valores de  $x$ , para ello se empleará la ecuación (16) mencionada anteriormente. La desviación estándar de los coeficientes se calculan empleando las ecuaciones (17 y 18).

A continuación en la siguiente tabla, se muestran los resultados:

Tabla 31. Resultados función respuesta

FUNCIÓN RESPUESTA	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	PROMEDIO
<b>PENDIENTE (b)</b>	0,0130	0,0134	0,0132	0,0132	0,0134	<b>0,0132</b>
<b>ERROR DE b (Sb)</b>	0,0003	0,0003	0,0002	0,0002	0,0002	<b>0,0002</b>
<b>INTERCEPTO (a)</b>	0,0008	-0,0013	0,0007	0,0005	0,0010	<b>0,0003</b>
<b>ERROR DE a (Sa)</b>	0,0025	0,0022	0,0016	0,0020	0,0016	<b>0,0020</b>
<b>COEFICIENTE DE COR. (<math>r^2</math>)</b>	0,9985	0,9984	0,9992	0,9986	0,9992	<b>0,9988</b>

Fuente: Elaboración Propia



Los intervalos de confianza, a un nivel de confianza del 95 % de los parámetros  $a$  y  $b$  son:

$$b \pm t \cdot S_b \rightarrow 0,0132 \pm 0,0005$$

$$a \pm t \cdot S_a \rightarrow 0,0003 \pm 0,0042$$

### 3.2.6.3 RANGOS (BAJO, MEDIO Y ALTO)

Se prepararon 10 patrones de: 2,5, 7,5 y 15 ppm  $\text{NH}_4$ . De los resultados obtenidos se determinó el coeficiente de variación porcentual (% C.V.) y el porcentaje de recuperación (% R) de los mismos. A continuación en la Tabla 32 se detallan los resultados.

Tabla 32. Resultados rangos (Bajo, medio y alto) nitrógeno amoniacal

	RANGO BAJO	RANGO MEDIO	RANGO ALTO
PATRÓN	2,5 ppm	7,5 ppm	15 ppm
P1	2,38	7,25	12,94
P2	2,45	6,52	14,26
P3	2,32	7,58	12,28
P4	2,51	7,78	14,62
P5	2,38	7,91	14,82
P6	2,25	7,51	14,36
P7	2,32	8,17	13,83
P8	2,58	7,64	13,96
P9	2,38	7,25	14,16
P10	2,58	7,71	14,88
PROMEDIO [X]	2,41	7,53	14,01
DESVIACIÓN EST. [S]	0,11	0,45	0,83
COEF.VARIABILIDAD C.V	0,05	0,06	0,06
COEF.VARIABILIDAD C.V %	4,68	6,02	5,91
% (R)	96,58	100,42	93,40

Fuente: Elaboración Propia

**Análisis (RANGOS):** De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa que el coeficiente de variación porcentual se encuentra alrededor del 6 %, mismo que se considera aceptable. En cuanto al porcentaje de recuperación se observa que se encuentra dentro de los valores fijados ( $\geq 85$  % de recuperación  $\leq 110$  %).



#### 4 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el proceso de validación del método de Olsen modificado, para determinar tanto fósforo disponible como nitrógeno amoniacal en suelo por espectrofotometría UV-Vis, se concluye que los resultados de ambos métodos son razonablemente aceptables y consistentes; cumpliéndose con los objetivos previamente fijados en el proceso de validación, por lo tanto ambos métodos se declaran validados y son aptos para ser utilizados en el Laboratorio de suelos de la Facultad de Ciencias Químicas.

Con referencia a los resultados de la validación del método de Olsen modificado para determinar fósforo disponible en suelo por espectrofotometría UV-Vis, se concluye que el método se declara validado por las siguientes razones:

- En cuanto al parámetro de la linealidad/ función respuesta, se estableció como objetivo que la ecuación lineal presente un coeficiente de determinación  $r^2 \geq 0,99$ , cumpliéndose satisfactoriamente pues el coeficiente de determinación encontrado fue de 0,9999.
- Con respecto a los límites de detección y cuantificación encontrados, tras realizar el análisis de blancos reactivo; se encontró que el límite de detección calculado fue de 0,17 ppm P y que el límite de cuantificación calculado fue de 0,57 ppm P; sin embargo se analizaron 10 patrones de concentración de 0,5 ppm P, cuantificándose exitosamente.
- El rango de trabajo establecido fue de 3 a 15 ppm para la validación, el mismo se estableció inicialmente en base a fuentes de consulta como Banegas Sanmartín (2014), McKean, (1993) y Díaz Romeu & Hunter (1978) y se corroboró que el mismo sea aceptable, al observarse que la recta de regresión lineal obtenida cumplía con el parámetro de linealidad, pues los resultados proporcionados fueron directamente proporcionales a la concentración de analito con la que se trabajó, obteniendo un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) mayor o igual 0,99.
- El porcentaje de recuperación, empleando como material de referencia una muestra de suelo de la Granja Integral Municipal San Antonio fue de 96 %, valor que se encuentra dentro del rango de 90 a 110 % planteados como objetivo.



- El coeficiente de variación porcentual (% C.V.) hallado en el análisis de la muestra de suelo fue del 5 %, valor que está dentro del valor establecido como objetivo ( $\leq 10$  %).
- Los valores del porcentaje de exactitud y el coeficiente de variación porcentual, en los resultados de los análisis en cuanto a los patrones analizados en el rango (bajo, medio y alto); también se encuentran dentro de los valores establecidos como objetivo.

Por otro lado, en base a los resultados de la validación del método de Olsen modificado para determinar nitrógeno amoniacal en suelo por espectrofotometría UV-Vis, se concluye que este método, también se declara como validado, debido a lo siguiente:

- En lo que respecta al parámetro de la linealidad/ función respuesta, se estableció dentro de los objetivos que la ecuación lineal tiene que encontrarse un coeficiente de determinación  $r^2 \geq 0,99$ , lo cual se cumplió favorablemente, pues el coeficiente de determinación encontrado fue de 0,9988.
- En el caso de los límites de detección y cuantificación, determinados tras realizar el análisis de blancos reactivo; se halló que el límite de detección calculado fue de 0,40 ppm N-NH<sub>4</sub> y que el límite de cuantificación calculado fue de 1,32 ppm N-NH<sub>4</sub>, sin embargo se analizó diez patrones de concentración de 1 ppm N-NH<sub>4</sub>, cuantificándose de forma satisfactoria, con una adecuada precisión y exactitud.
- El intervalo de trabajo establecido fue de 2,5 a 15 ppm para la validación, el mismo se estableció en un inicio, basándose en fuentes de consulta como Banegas Sanmartín (2014) y McKean, (1993) y se confirmó que el mismo sea aceptable, al observar que la recta de calibrado tenía un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) mayor o igual a 0,99.
- El porcentaje de recuperación empleando un material de referencia de concentración conocida en N-NH<sub>4</sub> fue de 89 %, valor que se encuentra dentro del rango de 85 a 110 % planteados como objetivo. Con respecto al coeficiente de variación porcentual (% C.V.) encontrado en el análisis empleando la muestra de suelo fue del 25 %, valor que está dentro del valor establecido como objetivo ( $\leq 30$  %).



- El porcentaje de exactitud y el coeficiente de variación porcentual, de los resultados obtenidos al analizar los patrones en el rango (bajo, medio y alto); también se encuentran dentro de los valores establecidos como objetivo.

## **5 RECOMENDACIONES**

- Se recomienda determinar nitrógeno amoniacal de forma inmediata, una vez que se dispongan las muestras de suelo en el laboratorio, ya que debido a procesos biológicos la concentración de amonio puede variar.
- Obtener patrones de referencia certificados, que permitan a futuro evaluar la exactitud de los resultados; así como adquirir pesas calibradas y certificadas para la respectiva calibración de la balanza empleada para los análisis.
- Se recomienda que a futuro se realice el cálculo de la incertidumbre del método, en miras a una acreditación.
- Realizar calibraciones periódicas y mantenimiento en el espectrofotómetro UV-Vis.
- Establecer un lugar apropiado para el almacenamiento de las muestras de estudio con la finalidad de evitar contaminaciones.
- Se debe evitar contaminar el material de vidrio con fósforo, para ello se debe evitar los polvos o jabones de lavar, ya que, usualmente estos productos contienen fosfatos.
- Los reactivos y el papel filtro que se escojan deben también estar libres en lo posible de compuestos de fósforo.
- La lectura de absorbancia de las muestras y patrones estándar preparados debe ser lo más rápida posible.
- En el caso de que la solución Olsen pH 8,5 se almacene para preparar en posteriores días, ya sea patrones o realizar extracciones, se recomienda verificar el pH de la solución previo a su utilización; ya que la misma con el paso del tiempo suele variar.
- Emplear celdas limpias y sin rayaduras.



## BIBLIOGRAFÍA

- Agrocalidad. (2018). *Instructivo INT/SFA/10. Muestreo para análisis de suelos*. Recuperado de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2018/02/05-INTSFA10.-Rev3.-Vigente.pdf>
- Álvarez Sánchez, M. E., & Marín Campos, A. (2011). *Manual de procedimientos analíticos para suelos y plantas*. Laboratorio de Química, Departamento de Suelos. Recuperado de [http://ecotech.uy/docs/suelos/Electronico\\_Manual\\_Procedimientos\\_Analiticos\\_2011\\_fertilidad.pdf](http://ecotech.uy/docs/suelos/Electronico_Manual_Procedimientos_Analiticos_2011_fertilidad.pdf)
- Arias Giraldo, L. M. (2014). *Estandarización de una metodología para la medición de Fosfatos ( $PO_4^{3-}$ ) por el método fotométrico en muestras de suelos en el Centro Integral de Diagnóstico Agropecuario de Risaralda (CIDAR)* (Tesis de pregrado). Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira. Recuperado de <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/handle/11059/4812>
- Banegas Sanmartín, D. F. (2014). *Evaluación de un compost maduro y su influencia Físico-Química en el cultivo experimental de brócoli (Brassica oleracea L.)* (Tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Cuenca. Recuperado de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/5190>
- Blaya, S. N., & García, G. N. (2003). *Química agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal*. Mundi-Prensa Libros.
- Boschetti, G., & Quintero, C. (2003). Determinación del fósforo disponible en el suelo por el método de Bray. Recuperado de [http://www.ipni.net/ppiweb/iaarg.nsf/\\$webindex/2EC0B2FF3E9A457103256D0500603C6A/\\$file/Boschetti+-+Determinacion-P.pdf](http://www.ipni.net/ppiweb/iaarg.nsf/$webindex/2EC0B2FF3E9A457103256D0500603C6A/$file/Boschetti+-+Determinacion-P.pdf)
- Bremner, J. M., & Keeney, D. R. (1965). Steam distillation methods for determination of ammonium, nitrate and nitrite. *Analytica Chimica Acta*, 32, 485–495. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88973-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88973-4)
- Carrasquero, A., & Adams, M. (2011). *Estudio del complejo amarillo vanadomolibdofosfórico para el análisis de fósforo en suelos*. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/277074724\\_ESTUDIO\\_DEL\\_COMPLEJO\\_AMARILLO\\_VANADOMOLIBDOFOSFORICO\\_PARA\\_EL\\_ANALISIS\\_DE\\_FOSFORO\\_EN\\_SUELOS](https://www.researchgate.net/publication/277074724_ESTUDIO_DEL_COMPLEJO_AMARILLO_VANADOMOLIBDOFOSFORICO_PARA_EL_ANALISIS_DE_FOSFORO_EN_SUELOS)
- Carrero A., A., Zambrano G., A., Hernández G., E., Contreras B., F., Machado D., D., Bianchi B., G., & Varela D., R. (2015). Comparación de dos métodos de extracción de fósforo disponible en un suelo ácido. *Avances en Química*, 10, 29–33.
- Casanova Olivo, E. F. (2005). *Introducción a la ciencia del suelo* (2 nd. Ed.). CDCH UCV.
- Cáseres Rueda, J. H. (1973). *Correlación y calibración de cinco métodos de análisis de fósforo asimilable, en suelos de la mesa central de México*. Escuela Nacional de



- Agricultura. Colegio de Postgrados. INIAP, México. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=54AzAQAAMAAJ&pg=PR8&dq=M%C3%A9todo+Bray+P1.-&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj60M-on-vaAhWDuFMKHTjTCMwQ6AEIJTAA#v=onepage&q=M%C3%A9todo%20Bray%20P1.-&f=false>
- Celaya, H., & Castellanos, A. E. (2011). Mineralización de nitrógeno en el suelo de zonas áridas y semiáridas. *Terra Latinoamericana*, 29 (3), 343–356.
- Chicaiza Hidalgo, N. E. C. (2001). *Correlación y calibración de métodos de análisis químico y determinación del nivel crítico de calcio en suelos ecuatorianos*. (Tesis de pregrado). Universidad Central del Ecuador, Quito - Ecuador.
- Chonay Pantzay, J. J. (2000). *Evaluación de soluciones extractoras en la fertilidad de los suelos para las regiones fisiográficas: Llanura costera del Pacífico y pendiente volcánica reciente de Guatemala*. Recuperado de <http://glifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt%201998.07.pdf>
- Comité conjunto para las guías en metrologías. (2012). *Vocabulario Internacional de Metrología. Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM)*. Recuperado de <http://www.cem.es/sites/default/files/vim-cem-2012web.pdf>
- Correndo, A., & García, F. (2017). Métodos de diagnóstico nutricional en cultivos extensivos en Argentina. *Archivo Agronómico* # 16, 4.
- Díaz Romeu, R., & Hunter, A. (1978). *Metodología de muestreo de suelos, análisis químico de suelos y tejido vegetal e investigación en invernadero*. Costa Rica: Bib. Orton IICA / CATIE.
- Dirección de fomento de tierras y aguas. (2002). *Los fertilizantes y su uso*. Rome: FAO. Recuperado de [www.fao.org/3/a-x4781s.pdf](http://www.fao.org/3/a-x4781s.pdf)
- Espinoza. (2018). *Guía de Validación de métodos de ensayo en laboratorios clínicos*. Recuperado de <http://www.acreditacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2018/02/G03-R00-Guia-Validacion-Lab-clini.pdf>
- Fassbender, H. W. (1983). *Suelos y sistemas de producción agroforestales*. Costa Rica: Bib. Orton IICA / CATIE.
- Fassbender, H. W. (1984). *Bases edafológicas de los sistemas de producción agroforestales*. Bib. Orton IICA / CATIE.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (1995). *Manual Técnico de la Fijación Simbiótica Del Nitrógeno: Leguminosa/Rhizobium*. Food & Agriculture Org.
- Gallego Picó, A., Garcinuño Martínez, R., & Morcillo Ortega, M. J. (2013). *Experimentación en química analítica*. Madrid: Editorial UNED.
- Gamboa Jaimes, J. J. (1971). *Dinámica del NPK en el suelo después de cinco fertilizaciones consecutivas*. Bib. Orton IICA / CATIE, Costa Rica.







- de Pereira. Pereira. Recuperado de <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/handle/11059/3140>
- Moyano, A., & Gallardo, J. (1986). *Distribución de diferentes formas de nitrógeno en horizontes superficiales de suelos cultivados del Centro- Oeste de España. Separata.* Recuperado de <http://digital.csic.es/bitstream/10261/57291/1/Distribuci%C3%B3n%20de%20diferentes%20formas%20de%20nitrogeno%20en%20horizontes%20superficiales%20de%20suelos%20cultivados%20del%20Centro-Oeste%20de%20Espa%C3%B1a.pdf>
- Mulki Piñeyros, M. (s/f). Validación de métodos.
- Murray R., S. (1991). *Estadística.* (R. Hernández Heredero, Trad.) (2nd. Ed.). México: McGRAW-HILL.
- Norma ISO 17025. (2005). *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.*
- Ochoa M., W. A., & Suárez V., S. (2003). Variabilidad espacial del nitrógeno disponible en Andisoles de la zona cafetera colombiana, 2, 179–189.
- OGA-GEC-016. (2007). *Política de Selección y Validación de Métodos de ensayo.* Recuperado de [http://www.oga.org.gt/wp-content/uploads/2013/08/oga\\_sistema/Políticas/pdf/OGA-GEC-016.pdf](http://www.oga.org.gt/wp-content/uploads/2013/08/oga_sistema/Políticas/pdf/OGA-GEC-016.pdf)
- Padilla G., W. (1973). *Muestreo e interpretación de suelos.* Recuperado de <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/4729>
- Perdomo. (s/f). *Nitrógeno.* Recuperado de <http://www.fagro.edu.uy/fertilidad/publica/Tomo%20N.pdf>
- Prendes, J. A. O., Khouri, E. A., & López, M. M. (2006). *Análisis de suelos y plantas y recomendaciones de abonado.* Universidad de Oviedo.
- Pulgarín, G. A. (2005). Determinación de nitratos y amonio en muestras de suelo Mediante el uso de electrodos selectivos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 58 (1), 2733–2740.
- RELASE. (2016). *Informe de la Red Nacional de Laboratorios de Suelos (RELASE).* Tumbaco. Recuperado de [http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/laboratorios/suelos-foliares-aguas/INFORME%20DE%20LA%20RED%20NACIONAL%20DE%20LABORATORIOS%20DE%20SUELOS%20\(RELASE\)%20INFORME%20GESTI%C3%93N%202015.pdf](http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/laboratorios/suelos-foliares-aguas/INFORME%20DE%20LA%20RED%20NACIONAL%20DE%20LABORATORIOS%20DE%20SUELOS%20(RELASE)%20INFORME%20GESTI%C3%93N%202015.pdf)
- Roda Vaca, J. L., Ruiz Alderete, D., & Viera, M. S. (2011). Calibración de tres métodos de extracción de fosforo asimilable en suelos agrícolas del departamento de Santa Cruz. *Universidad, Ciencia y Sociedad*, 55–61.
- Rodríguez, C. B. (2008). *Biología y Geología 4º ESO.* Editex.
- Rodríguez, M., & Flórez, V. (2004). Elementos Esenciales y Beneficiosos. *Guzmán, M. y López-Galvez (Ed). Fertirriego: Tecnologías y Programación en Agroplasticultura.*



- CYTED. ISBN 84-96023-27-3. DL: A1-290-2004. <http://www.cytcd.org>. Recuperado de <http://repositorio.ual.es/handle/10835/3133>
- Rojas Ozuna, A. J. (2013). *Aplicación de diferentes fuentes y dosis de fertilizantes fosfatados en el cultivo de soja en un oxisol* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. Recuperado de <http://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/TES-BN-017.pdf>
- Salinas, J. G., & García, R. (1985). *Métodos químicos para el análisis de suelos ácidos y plantas forrajeras*. CIAT.
- Salvatierra Bravo, W. D. (2002). *Incremento de la productividad del Banano mediante el uso eficiente de la fertilización N, K y densidades altas de plantas* (Tesis de pregrado). Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, Manta - Ecuador.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2008). *Principios de análisis instrumental* (6ta. Ed.). México, D.F.: Cengage Learning.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2001). *Principios de análisis instrumental* (6ta. Ed.). Madrid, España: McGRAW-HILL
- University Corporation for Atmospheric Research (UCAR). (2015). *Nitrogen in the Earth System*. Recuperado el 27 de abril de 2018, de <https://www2.ucar.edu/news/backgrounders/nitrogen-earth-system>
- Vega Rodríguez, G. (2011). *Comisión de control analítico y ampliación de cobertura. Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos*. Recuperado de <http://www.cofepris.gob.mx/TyS/Documents/TercerosAutorizados/cvfaq032011.pdf>
- Welch, R. M., & Shuman, L. (1995). Micronutrient Nutrition of Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14 (1), 49–82. doi:10.1080/07352689509701922





ANEXOS

Anexo 1. Etiquetado de una muestra básico

MUESTRA DE SUELO		
FECHA DE TOMA DE MUESTRA		
LOCALIZACIÓN	PROVINCIA	
	CANTÓN	
	PARROQUIA	
PERSONA A CARGO DEL MUESTREO		
LOTE O IDENTIFICACIÓN		
PROPIETARIO DE LA MUESTRA		
TELÉFONO		
DIRECCIÓN		
CORREO ELECTRÓNICO		
ÚLTIMO CULTIVO		
PRÓXIMO CULTIVO		
ABONO O FERTILIZANTES USADOS		
EDAD DEL CULTIVO		

Anexo 2. Resultados INIAP – Estación Experimental del Austro

	<b>ESTACION EXPERIMENTAL DEL AUSTRO</b> <b>LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS</b> km 12 1/2 vía El Descenso - BULLCAY - Gualaquiza www@iniap.gob.ec Azuay - Ecuador TeleFax: (07) 2171161																																														
<b>INFORME DE ANALISIS DE SUELOS</b>																																															
<b>DATOS DEL PROPIETARIO</b> Nombre : YESSENIA GUARACA (2) Dirección : Ciudad : GUALACEO Teléfono : N/E Técnico : Correo-e : N/E	<b>DATOS DE LA PROPIEDAD</b> Nombre : Provincia : AZUAY Parroquia : GUALACEO Ubicación : SAN ANTONIO Latitud : Longitud:	<b>DATOS DE LA MUESTRA</b> Fecha Muestreo : 26/01/2018 Fecha Ingreso : 31/01/2018 Fecha Emisión : 02/02/2018 Cultivo Actual : N/E																																													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: small;"> <tr> <th rowspan="2">N° Laborat.</th> <th rowspan="2">Identificación del Lote</th> <th rowspan="2">pH</th> <th colspan="3">ppm</th> <th colspan="3">mg/100mL</th> <th colspan="4">ppm</th> <th>mg/100mL</th> <th rowspan="2">Σ Bases</th> <th rowspan="2">Ca/Mg</th> <th rowspan="2">Mg/K</th> <th rowspan="2">(Ca+Mg)/K</th> </tr> <tr> <th>N</th> <th>P</th> <th>K</th> <th>Ca</th> <th>Mg</th> <th>Zn</th> <th>Cu</th> <th>Fe</th> <th>Mn</th> </tr> <tr> <td>5283</td> <td></td> <td>6.2 LAc</td> <td>31.22 M</td> <td>42.72 A</td> <td>0.52 A</td> <td>14.47 A</td> <td>2.72 M</td> <td></td> <td>5.5 M</td> <td>4.0 M</td> <td>33.0 M</td> <td>9.0 M</td> <td></td> <td>17.71</td> <td>5.32 M</td> <td>5.23 M</td> <td>33.06 M</td> </tr> </table>			N° Laborat.	Identificación del Lote	pH	ppm			mg/100mL			ppm				mg/100mL	Σ Bases	Ca/Mg	Mg/K	(Ca+Mg)/K	N	P	K	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe	Mn	5283		6.2 LAc	31.22 M	42.72 A	0.52 A	14.47 A	2.72 M		5.5 M	4.0 M	33.0 M	9.0 M		17.71	5.32 M	5.23 M	33.06 M
N° Laborat.	Identificación del Lote	pH				ppm			mg/100mL			ppm				mg/100mL					Σ Bases	Ca/Mg	Mg/K	(Ca+Mg)/K																							
			N	P	K	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe	Mn																																				
5283		6.2 LAc	31.22 M	42.72 A	0.52 A	14.47 A	2.72 M		5.5 M	4.0 M	33.0 M	9.0 M		17.71	5.32 M	5.23 M	33.06 M																														

Interpretación		
N, P, K, Ca, Mg, S		
Zn, Cu, Fe, Mn, B, Cl	pH	
B = Bajo	MAC = Muy Ácido	N = Neutro
M = Medio	As = Ácido	LAI = Lig. Alcalino
A = Alto	MeAc = Med. Ácido	MeAl = Med. Alcalino
	LAc = Lig. Ácido	Al = Ácido
	PNL = Muy Neutro	ME = Muy Neutro Cal

Caracterización	Metodología	Referencia
M, P	Colorimétrica	Coven
K, Ca, Mg	Absorción	Modificado
Zn, Cu, Fe, Mn	Atómica	pH 6.5
pH	Potenciométrico	Suelo agua (1:2.5)
S	Turbidimétrico	Póntico de Ca
B	Colorimétrica	Modificado

Niveles Nacionales de Referencia					
N	20 - 40	Mg	1.0 - 3	Fe	20 - 40
P	10 - 20	S	10 - 20	Mn	5 - 10
K	0.2 - 0.4	Zn	0.3 - 0.5	B	0.5 - 1.0
Cu	0.5 - 1.0	Cu	1.0 - 1.5	Cl	-

N/E : No entrega.

Se prohíbe la reproducción total o parcial de este documento, los datos deberán ser apropiadamente citados.

Responsable Laboratorio

UNIVERSIDAD EXPERIMENTAL CHUQUIPATA  
Laboratorio de Suelos y Aguas

Laboratorista

Fecha de Impresión: 26/02/2018

Página 1 de 2



**ESTACION EXPERIMENTAL DEL AUSTRO**  
**LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS**  
Avn 12-1/2 vs E/ Desamparo - BULLCAY - Gualaceo - wms@iniap.gob.ec  
Azuay - Ecuador TeleFax: (07) 2171181



### REPORTE DE ANALISIS DE SUELOS

DATOS DEL PROPIETARIO			
Nombre : YESSENIA GUARACA (2)	Teléfono : N/E		
Dirección :	e-mail : N/E		
Ciudad : Gualaceo			

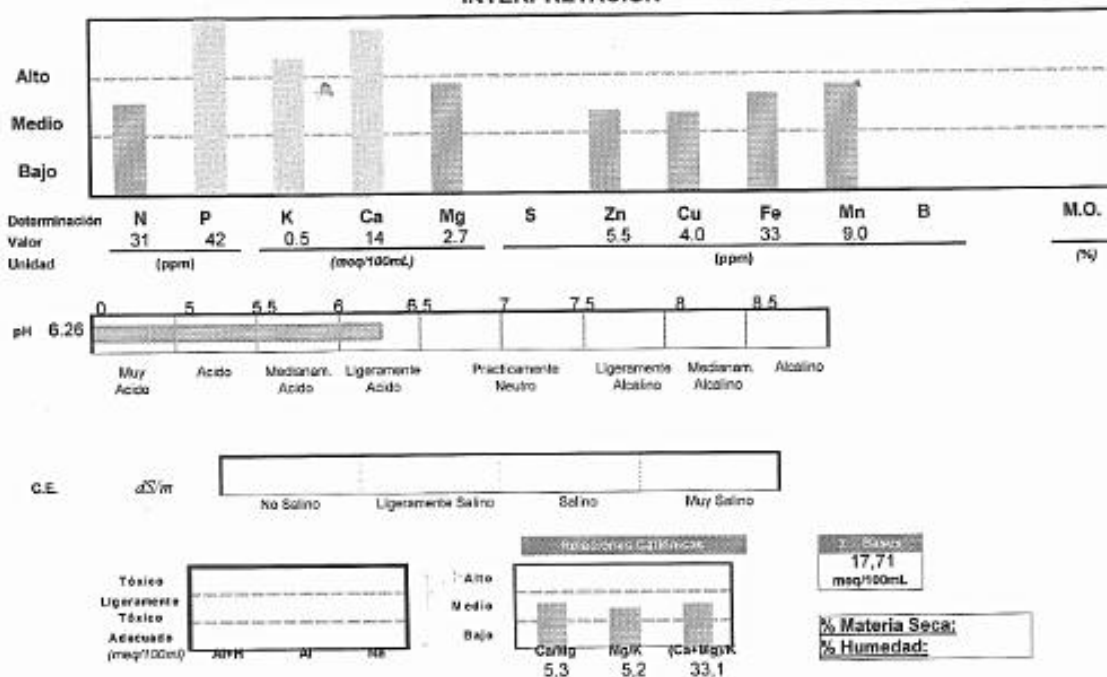
  

DATOS DE LA PROPIEDAD			
Nombre :	Parroquia : Gualaceo		
Provincia : Azuay	Ubicación : SAN ANTONIO		
Cantón : Gualaceo	Latitud : Longitud :		

DATOS DE LA MUESTRA			
No. Laboratorio : 5283	Responsable Muestreo : Cliente	Factura No. : 0	
Identificación :	Fecha Muestreo : 26/01/2018	Fecha Análisis : 29/01/2018	
Cultivo Actual : N/E	Fecha Ingreso : 31/01/2018	Fecha Emisión : 02/02/2018	

### INTERPRETACION



Determinación	Metodología	Extractante
N, P	Colorimetría	Clean Modified
K, Ca, Mg	Absorción Atómica	Clean Modified pH 8.5
S	Turbidimetría	Fosfato de Ca Modificado
B	Colorimetría	Acido Salitrado
Cl	Volumetría	Acido Salitrado
M.O.	Calibración	No aplica

Determinación	Metodología	Extractante
pH	Potenciometría	Agua (1:2.5)
CE	Conductimetría	Pasta Saturada
Textura	Estimación	No Aplica
Al	Volumetría	K, Cl, 1 N
Nitrogeno	Alcalinización	Pasta Saturada
E. Base	Alcalinización	Clean Modified pH 8.5

Niveles de Referencia Óptimos					
N	20 - 40	S	10 - 20	B	0.5 - 1.5
P	10 - 20	Zn	4 - 8	Cl	1 - 3
K	0.2 - 0.4	Ca	1 - 10	M.O.	2.5 - 15.0
Ca	4 - 8	Fe	20 - 40	Al-H	0.5 - 1.5
Mg	1 - 3	Mn	5 - 10	Al	0.1 - 1.5

Responsable laboratorio

Laboratorista

NT: No Entrega  
Los resultados emitidos en este informe, corresponden únicamente a la(s) muestra(s) sometida(s) al ensayo.  
Se prohíbe la reproducción parcial, si se va a fotocopiar que sea de todo el documento original

Fecha Impresión : 28/02/2018





**ESTACION EXPERIMENTAL DEL AUSTRO**  
**LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS**  
 km 12 1/2 vía El Descanso - BULLCAY - Gualaceo www@iniap.gob.ec  
 Azuay - Ecuador TeleFax: (07) 2171161



### INFORME DE ANALISIS DE SUELOS

DATOS DEL PROPIETARIO				DATOS DE LA PROPIEDAD				DATOS DE LA MUESTRA			
Nombre :	YESSENIA GUARACA			Nombre :				Fecha Muestreo :	22/12/2017		
Dirección :				Provincia :	AZUAY			Fecha Ingreso :	22/12/2017		
Ciudad :	GUALACEO			Parroquia :	GUALACEO			Fecha Emisión :	29/12/2017		
Teléfono :	N/E	Correo-e :	N/E	Ubicación :	SAN ANTONIO			Cultivo Actual :	N/E		
Técnico :				Latitud :							
				Longitud :							

N° Laborat.	Identificación	Textura (%)			Clase Textural	cm <sup>3</sup> /cm <sup>3</sup>				cm <sup>3</sup> /h		g/cm <sup>3</sup>			mg/100mL		dS/m	%	(%)	(%)
		Arena	Limo	Arcilla		C.C.	Sat.	P.M.	A.D.	C.H.	D.A.	Al+H	Al	Na	C.E.	M.O.	M.S.	H.		
5241		72	14	14	Franco-Arenoso	0.20	0.43	0.11	0.09	1.52	1.47						0.37 NS	2.82	B	

Series portátiles		
Al+H, Al, Na	C.E.	M.O.
Al = Adecuado	NS = No Salino	B = Bajo
LT = Ligeros Toxos	LS = Lg. Salino	M = Medio
T = Toxos	S = Salino	A = Alto
	MS = Muy Salino	

Muestreo	
C.C.	Capacidad de Campo
Sat.	Saturación
P.M.	Punto de Marchitez
A.D.	Agua Disponible
C.H.	Conductividad Hidráulica

Análisis de Suelos	
C.E.	Conductividad Eléctrica
N.O.	Materia Orgánica
D.A.	Densidad Aparente
Nr	Nitrógeno Total
C/N	Relación Carbono: Nitrógeno
N.E.	Materia Seca
H.	Humedad

Determinaciones	
M.O.	Análisis elemental (TOC)
Na	Extracción de potasio adsorbida
C.E.	Extracción de potasio adsorbida
Na	Suero de Kjerfvi

Niveles de Saturación	
Liq. Toxico	Liq. Salino
Al+H 0.10 - 1.00	C.E. 2.00 - 4.00
Al 0.31 - 1.00	Medio
Na 0.50 - 1.00	M.O. 2.10 - 5.00

Responsable Laboratorio

N/E: No Entrega

Se prohíbe la reproducción total o parcial de este documento, los datos deberán ser apropiadamente citados.

INIAP  
 GRANJA EXPERIMENTAL CHILQUIPATA  
 Laboratorio de Suelos y Aguas

Fecha de Impresión: 03/01/2018

Página 2 de 2



INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS  
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL AUSTRO

### REPORTE DE ANALISIS DE SUELOS

Nº Muestra Laboratorio:	5241	DATOS GENERALES DE LA MUESTRA				MUESTRA / CODIGO	---			
Propietario:	Yessenia Guaraca		Ubicación:	Sector / Finca	Parroquia	Cantón	Provincia			
Fecha entrega de resultados:	03/01/2018			San Antonio	Gualaceo	Gualaceo	Azuay			
RESULTADOS		Cultivo/Usos: ---								
p.H.	6.32	Muy Ácido (0 < 5)	Ácido (5,5)	(5 - Mediana Ácido (> 5,5 - 6)	Ligeram. Ácido (> 6 - 6,5)	Práctic. Neutro (6,5 - 7,5)	(> 7,5 - 8)	Ligeram. Alcalino (> 8 - 8,5)	Mediana Alcalino (> 8,5)	Alcalino (> 8,5)
Clase Textural ( % arena, % arcilla, % limo )	(72, 14, 14)	Franco Arenoso								
Materia Orgánica %	2.82	BAJO								

### ANALISIS DE CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIONICO

Miliequivalentes / 100 g. de suelo				Suma de Bases	% Saturación de Bases	CIC
K	Ca	Mg	Na	Meq / 100 g. de suelo	SATURADO	Meq / 100 g. de suelo
0.31	14.50	2.72	3.44	20.97		24.08

INIAP  
ESTACIÓN EXPERIMENTAL CHUCUPATA  
Laboratorio de Suelos y Aguas  
LABORATORISTA



### Anexo 3. Resultados INIAP – Estación Experimental del Litoral Sur

	<b>ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL LITORAL SUR</b> <b>"DR. ENRIQUE AMPUERO PAREJA"</b> <b>LABORATORIO DE SUELOS, TEJIDOS VEGETALES Y AGUAS</b> Km. 26 Vía Durán - Tambo Apdo. Postal 09-01-7069 Yaguachi - Guayas - Ecuador Teléfono: 042724280 - 042724119 e-mail: labsuelos.eefs@iniap.gob.ec
---	---

#### INFORME DE ANALISIS DE SUELOS

DATOS DEL PROPIETARIO		DATOS DE LA PROPIEDAD		DATOS DE LA MUESTRA	
Nombre :	YESSENIA VERONICA GUARACA BECERRA	Nombre :	GRANJA MUNICIPAL SAN ANTONIO	Informe No. :	020714
Dirección :	AV.LOJA Y SANTA BARBARA	Provincia :	AZUAY	Responsable Muestreo :	Cliente
Ciudad :	GUALACEO	Cantón :	GUALACEO	Fecha Muestreo :	10/02/2018
Teléfono :	0980800770	Parroquia :	GUALACEO	Fecha Ingreso :	12/03/2018
Fax :	N/E	Ubicación :	N/E	Condiciones Ambientales :	T°C: 26.0 %H: 43.0
				Factura No. :	04840
				Fecha Análisis :	19/03/2018
				Fecha Emisión :	20/03/2018
				Fecha impresión :	20/03/2018
				Cultivo Actual :	ALFALFA

Nº Laborat.	Identificación del Lote	pH	ug/ml											
			* NH 4	* P	K	* Ca	* Mg	* S	* Zn	Cu	*Fe	* Mn	*B	* Cl
67064	MUESTRA 1 (22-22-17)	6.9 <b>PN</b>	13 <b>B</b>	38 <b>A</b>	127 <b>M</b>									
67065	MUESTRA 2 (10-2-18)	7.0 <b>N</b>	10 <b>B</b>	40 <b>A</b>	130 <b>M</b>									

Interpretación	pH
NH <sub>4</sub> , P, K, Ca, Mg, S	<b>Mu</b> = Muy Acido
Zn, Cu, Fe, Mn, B, Cl	<b>As</b> = Ácido
	<b>M</b> = Medio
	<b>A</b> = Alto
	<b>PN</b> = Ptas. Neutro
	<b>N</b> = Neutro
	<b>LA</b> = Lq. Alcalino
	<b>MA</b> = Mod. Acido
	<b>LAe</b> = Lq. Acido
	<b>PH</b> = Ptas. Neutro
	<b>NeN</b> = Mod. Alcalino
	<b>Al</b> = Alcalino
	<b>RC</b> = Requiere Cal

Determinación	Metodología	Extractante
NH <sub>4</sub> , P	Colorimetría	Olsen
K, Ca, Mg	Absorción	Modificado
Zn, Cu, Fe, Mn	Atómica	pH 6.5
B	Turbidimetría	Fosfato de Ge
S	Colorimetría	Molibdato
Cl	Volumétrica	Pasta Saturada
pH	Potenciometría	Suelto: agua (1:2.5)

Niveles de Referencia Óptimos		
Medio (ug/ml)		
NH <sub>4</sub> 4 - 20	Mg 121.5 - 243	Fe 20 - 40
P 10 - 20	S 10 - 30	Mn 5 - 15
K 75 - 150	Zn 2.0 - 7.0	B 0.5 - 1.0
Ca 800 - 1600	Cu 1.0 - 4.0	Cl 17 - 34

N/E = No entregado

<LC = Menor al Límite de Cuantificación

Los resultados emitidos en este informe, corresponden únicamente a la(s) muestra(s) sometida(s) al ensayo

Los ensayos marcados con (\*) no están incluidos en el alcance de acreditación solicitado al OAE

Las opiniones, interpretaciones, etc., que se indican a continuación, están fuera del alcance de acreditación solicitado al OAE

== Ensayo subcontratado

Se prohíbe la reproducción parcial, si se va a copiar que sea en su totalidad

  
 Responsable Técnico del Laboratorio  
 Mgs. Diana Acosta J.

Página 1 de 2



**ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL LITORAL SUR**  
**"DR. ENRIQUE AMPUERO PAREJA"**  
**LABORATORIO DE SUELOS, TEJIDOS VEGETALES Y AGUAS**

Km. 26 Vía Durán - Tambo Apdo. Postal 09-01-7069 Yaguachi - Guayas - Ecuador  
 Teléfono: 042724260 - 042724119 e-mail: lab\_suelos.oets@iniap.gob.ec

**INFORME DE ANALISIS DE SUELOS**

DATOS DEL PROPIETARIO			DATOS DE LA PROPIEDAD			DATOS DE LA MUESTRA					
Nombre	:	YESSENIA VERONICA GUARACA BECERRA	Nombre	:	GRANJA MUNICIPAL SAN ANTO	Informe No.	:	020714	Factura No.	:	04840
Dirección	:	AV.LOJA Y SANTA BARBARA	Provincia	:	AZUAY	Responsable Muestreo	:	Cliente	Fecha Análisis	:	19/03/2018
Ciudad	:	GUALACEO	Cantón	:	GUALACEO	Fecha Muestreo	:	10/02/2018	Fecha Emisión	:	20/03/2018
Teléfono	:	0980800770	Parroquia	:	GUALACEO	Fecha Ingreso	:	12/03/2018	Fecha Impresión	:	20/03/2018
Fax	:	N/E	Ubicación	:	N/E	Condiciones Ambientales	:	T°C:26.0 %H: 43.0	Cultivo Actual	:	ALFALFA

N° Laborat.	Identificación	* Textura (%)			* Clase Textural	meg/100ml			m.S/cm	C.E.	M.O. (%)	meg/100ml				Ca	Mg	Ca+Mg
		Arena	Limo	Arcilla		* A+H	* Al	* Na				K	* Ca	* Mg	Σ Bases	Mg	K	K
67064	MUESTRA 1 (22-22-17)											0.33 M						
67065	MUESTRA 2 (10-2-18)											0.33 M						

Interpretación	
A+H, Al, Na	C.E.
Ad = Adecuado	NS = No Salino
LT = Ligeram. Tóxico	LS = Ligo. Salino
T = Tóxico	S = Salino
	MS = Muy Salino

Abreviatura
C.E. Conductividad Eléctrica
M.O. Materia Orgánica
CIC Capacidad de Intercambio Catiónico

Denominación	Metodología	Extratante
M.O.	Walkley Black	Dióxido de K
CIC		Ahorro de Amonio
Na		Cloruro de Bario
C.E.	Extracto de pasta saturada	Agua

Niveles de Referencia			
Lig. Yóneo meg/100ml	Lig. Salino (dSm)	Medio	Medio (meg/100ml)
A+H 0.01 - 1.5	C.E. 2.0 - 4.0	Ca/Mg 2.9 - 5.0	K 0.2 - 0.4
Al 0.01 - 1.0	Medio (%)	Mg/K 2.5 - 10.0	Ca 4 - 6
Na 0.5 - 1.0	M.O. 3.1 - 5.0	(Ca+Mg)/K 12.5 - 50.0	Mg 1 - 2

N/E = No entregado  
 <LC = Menor al Límite de Cuantificación  
 Los resultados emitidos en este informe, corresponden únicamente a la(s) muestra(s) sometida(s) al ensayo.  
 Los ensayos marcados con (\*) no están incluidos en el alcance de acreditación solicitado al OAE.  
 Las opiniones, interpretaciones, etc. que se indican a continuación, están fuera del alcance de acreditación solicitada al OAE.  
 \*\* Ensayo subcontratado.  
 Se prohíbe la reproducción parcial, si se va a copiar que sea en su totalidad

  
 Responsable Técnico del Laboratorio

\*-c Diana Acosta J.

Página 2 de 2



#### Anexo 4. Fotografías



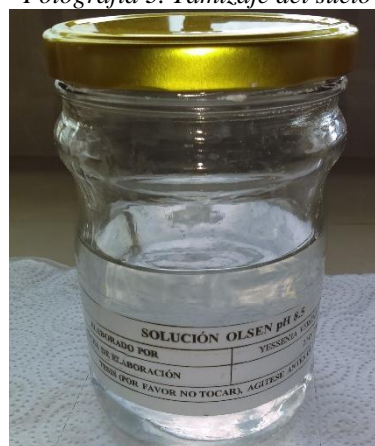
Fotografía 2. Muestreo del suelo



Fotografía 3. Tamizaje del suelo



Fotografía 4. Proceso de cuarteo



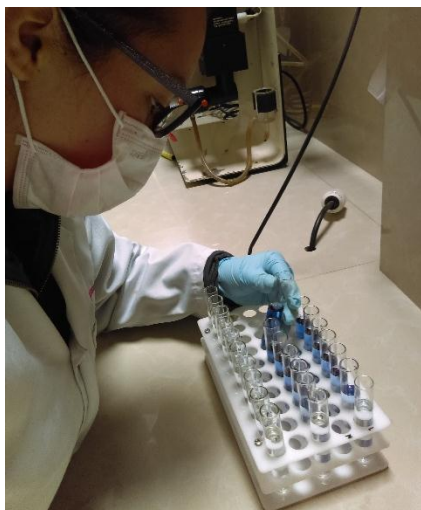
Fotografía 5. Solución Olsen modificada pH 8,5



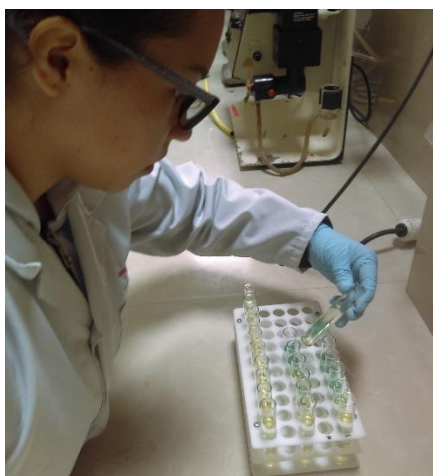
Fotografía 6. Adición de la solución Olsen  
Modificada pH 8,5 al suelo



Fotografía 7. Obtención del extracto de suelo



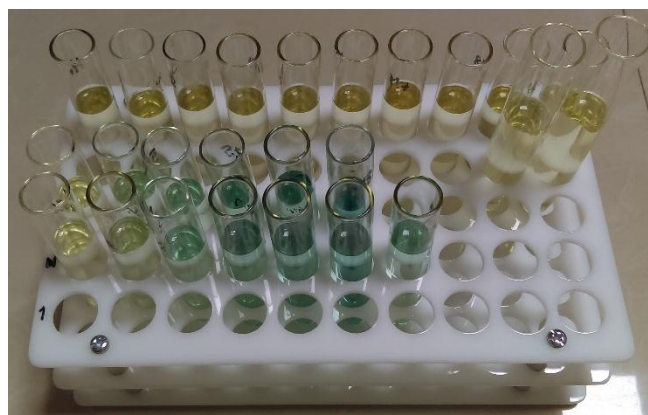
Fotografía 8. Determinación de fósforo por el método de Olsen modificado



Fotografía 10. Determinación de nitrógeno amoniacal por el método de Olsen modificado



Fotografía 9. Determinación de fósforo por el método de Olsen modificado (Obsérvese el desarrollo de la intensidad del color del complejo de azul de fosfomolibdato )



Fotografía 11. Determinación de nitrógeno amoniacal por el método de Olsen modificado (Obsérvese el desarrollo de la intensidad del color del complejo de azul indofenol )



*Fotografía 12. Lectura en el espectrofotómetro UV-Vis*